

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Proteómica diferencial da polineuropatia amiloidótica familiar: para além da genética

Ana Cristina Ribeiro da Silva

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Proteómica diferencial da polineuropatia amiloidótica familiar: para além da genética

Ana Cristina Ribeiro da Silva

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação de Tese de Mestrado orientada por

Doutor Carlos Cordeiro e Doutor Gonçalo da Costa

2011

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que de forma mais ou menos directa me acompanharam ao longo do último ano num percurso de aprendizagem e crescimento, intelectual e pessoal.

Não posso deixar de passar um especial agradecimento à Professora Ana Ponces, assim como ao restante Grupo de Enzimologia, por me ter acolhido no seu seio de investigação.

Aos meus orientadores, Dr. Carlos Cordeiro e Dr. Gonçalo da Costa, agradeço todos os ensinamentos e confiança em mim depositados. Foi realmente muito importante o acompanhamento diário e o suporte prestado a todos os níveis, a partilha de experiências, discussões e opiniões que me permitem crescer como cientista.

Aos meus amigos e colegas laboratório, em especial ao Samuel, Ricardo e Gonçalo (Covas), ... , obrigada pelo apoio incondicional e por tornarem o meu dia-a-dia muito mais animado e divertido.

Finalmente, à minha família. Avós, irmão, Mãe e Pai. Pelo incentivo, apoio, pela amizade, companhia e paciência (muita!). Por acreditarem a mim.

O meu sincero agradecimento a todos.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	VII
SUMMARY	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA	XIV
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
I - INTRODUÇÃO	1
1- Polineuropatia Amiloidótica Familiar.....	3
1.1 Das amiloidoses à Polineuropatia Amiloidótica Familiar: contexto histórico e epidemiologia	3
1.2 Sintomatologia	6
2 - A PAF e a Transtirretina: do gene à proteína	7
2.1 - O gene e a expressão de TTR	7
2.2 A proteína	8
2.3 Função da TTR.....	9
2.4 Mutações e amiloidogenecidade	11
2.5 Patogénese: os modelos de agregação	12
2.6 Patofisiologia: toxicidade induzida	15
2.7 A heterogeneidade fenotípica: a importância de biomarcadores, dos estados assintomáticos e da quantificação da TTR em circulação	16
3 - A TTR e outras doenças neurodegenerativas.....	18
3.1 Amiloidose Senil Sistémica (SSA)	18
4 - A glicação proteica	19
4.1 Conceitos gerais.....	20
4.2 Os produtos de glicação	22
4.3 O sistema dos Glioxalases	23
4.4 A glicação proteica em doenças amilóides e neurodegenerativas	25
4.5 Glicação e a PAF.....	26
5 - O transplante hepático em PAF	27
5.1 O transplante hepático de cadáver (CLT).....	27
5.2 O transplante hepático sequencial (dominó) (DLT) e aquisição de doença amilóide....	28
5.3 Outros tratamentos	29

II – MATERIAIS E MÉTODOS	31
1 - Obtenção das amostras de plasma humano	33
1.1 Colheita	33
1.2 Quantificação proteica pelo método de Bradford	34
2 - Electroforese desnaturante unidimensional: SDS-PAGE	34
2.1 Fundamentos teóricos	34
2.2 Os géis	36
2.3 Tratamento e aplicação das amostras	37
2.3.1 Amostras de plasma	37
2.4 Corrida electroforética	37
2.5 Coloração dos géis	38
3 - Western blotting	38
3.1 Fundamentos teóricos	38
3.2 Transferência	39
3.3 Bloqueio e incubação com anticorpos 1º e 2º	40
3.4 Revelação	41
3.5 Análise por Phoretix 1D	41
4 - Electroforese bidimensional	42
4.1 Fundamentos teóricos	42
4.2 Preparação, aplicação da amostra e focagem isoelectrica	43
4.3 SDS-PAGE: separação segunda dimensão	44
4.4 Análise dos géis (Progenesis SameSpots)	45
5 - Espectrometria de massa	45
5.1 Fundamentos teóricos	45
5.1.1 Métodos de ionização	46
5.1.1.1 MALDI	47
5.1.2 Analisadores de massa (AM)	48
5.1.2.1 TOF	48
5.1.2.1.1 TOF-TOF	49
5.1.2.2 FT-ICR	50
5.1.3 Detectores	51
5.2 Preparação e análise da amostra	51
5.2.1 Digestão <i>in gel</i> das proteínas	51
5.2.2 Digestão com tripsina	52
5.2.3 Aplicação dos digeridos na placa de MALDI	52
5.3 Obtenção dos espectros de massa	52
5.4 Identificação das proteínas por PMF	53
5.5 Quantificação relativa das formas <i>wild-type</i> e mutante da TTR plasmática	53
5.6 Análise estatística dos dados: teste <i>T-student</i>	53
III - RESULTADOS.....	55

1 - Quantificação da proteína total	57
2 - Quantificação relativa das variantes <i>wild-type</i> e V30M da TTR no plasma de indivíduos assintomáticos, doentes e transplantados	58
2.1 Separação da TTR e identificação por Western blot	58
2.2 Identificação da TTR <i>wild-type</i> e V30M por <i>Peptide mass fingerprint</i> (PMF)	60
2.2.1 Análise dos péptidos tripticos identificados por MSMS	63
2.3 Quantificação relativa das variantes <i>wild-type</i> e V30M no plasma	64
3 - A glicação na PAF: análise dos níveis de glicação proteica no plasma e comparação da expressão de proteínas relacionadas com AGEs	68
3.1 Níveis de glicação diferenciais entre indivíduos assintomáticos e doentes PAF não transplantados	68
3.2 A PAF e os sistemas de defesa anti-glicante: Glioxalases e Aldose Reductase	70
4 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas no plasma de indivíduos assintomáticos e doentes PAF não transplantados por electroforese bidimensional	73
4.1 - Análise dos géis 2D com o <i>software</i> Progenesis SameSpots: identificação dos <i>spots</i> diferencialmente expressos	73
4.2 Identificação das proteínas diferencialmente expressas no plasma de indivíduos assintomáticos e doentes PAFNT	75
 IV - DISCUSSÃO	 81
 V - CONSIDERAÇÕES FINAIS	 91
 VI - REFERÊNCIAS	 95
 VII - ANEXOS	 115
1 - Tabelas	117
2 - Figuras	120
3 - Artigos	121

RESUMO

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) é uma doença hereditária e degenerativa autossómica dominante que constitui um paradigma na forma exemplar como tem sido descrita e estudada nas suas múltiplas vertentes, incluindo a abordagem terapêutica. Porém, como consequência de uma aprendizagem cumulativa e de observações fenotípicas que não encontram explicação na simples ocorrência de mutações pontuais na cadeia polipeptídica da Transtirretina (TTR), cada vez mais se sente a necessidade de ruptura do modelo actual de patogénese desta doença, caracterizada pela formação e deposição de fibras amilóides cujo principal componente é a TTR.

Virado para criação de um novo paradigma mais abrangente da PAF, o presente trabalho apostou numa abordagem proteómica comparativa entre os vários estados de progressão da Paramiloidose, para o qual utilizou amostras de plasma de indivíduos portadores heterozigóticos da mutação V30M assintomáticos, com manifestações clínicas da PAF e não portadores de mutações conhecidas da TTR. Foram também utilizadas amostras de plasma de pacientes que - por possuírem doença hepática grave - receberam um fígado PAF (DLTs) e de doentes PAF que receberam um fígado *wild-type* (CTLs).

O trabalho desenvolvido mostrou inequivocamente que a relação da TTR *wild-type* com o mutante V30M (60 vs 40% em circulação) não varia com a progressão da doença, e foi ainda confirmado o envolvimento da glicação na PAF, a qual apresenta um padrão específico que se encontra exclusivamente aumentado em doentes PAF não transplantados e DLTs. Por outro lado, também se observou uma expressão aumentada de um dos enzimas que controla os níveis de metilgloxal intracelulares - um dos principais agentes glicantes *in vivo* - apenas em indivíduos assintomáticos, razão pela qual os níveis de glicação observados foram mais baixos. Deste trabalho resultou ainda a identificação de um conjunto relevante de proteínas no contexto da PAF. Muitas são interactuantes da TTR no plasma e apresentam funções de interesse, como chaperone molecular, e relacionam-se em vários processos biológicos.

A execução deste trabalho permite reforçar o envolvimento de factores não genéticos no modelo de patogénese da PAF.

Palavras-chave: Polineuropatia amiloidótica familiar, Transtirretina, V30M, portadores assintomáticos, glicação.

SUMMARY

Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP) is a hereditary autosomal dominant degenerative disease which is a paradigm in the exemplary manner as has been described and studied in its multiple aspects, including the therapeutic approach. However, as a result of a cumulative learning and of phenotypic observations that have no simple explanation in the occurrence of mutations in the polypeptide chain Transthyretin (TTR), more and more there is a necessity to break the current model of pathogenesis of this disease, characterized by formation and deposition of amyloid fibrils whose main component is TTR.

Facing the creation of a new FAP paradigm, more comprehensive than the existing one, this work's efforts were turned to a comparative proteomic approach between the progression states of the Paramyloidosis, for which were used plasma samples from heterozygous carriers of the V30M mutation – asymptomatic subjects and patients with clinical manifestations of FAP - and also healthy individuals with no known TTR mutation. In this study were also used plasma samples from patients – suffering from severe hepatic disease - that received a FAP liver (DLTs) - and FAP patient who got a wild-type liver (CLTs).

The work clearly showed that TTR wild-type and V30M ratio (60 vs 40%) does not vary with disease progression, and was further confirmed the involvement of glycation in FAP, which has a specific pattern which is only increased in non-transplanted FAP patients and DLTs. On the other hand, we also observed and increased expression of an enzyme that controls intracellular levels of methylglyoxal – one of the main glycation agent in vivo – just in asymptomatic individuals, which is why the observed glycation levels were lower. From this work, it was also possible the identification of a relevant set of proteins in the FAP context. Many are TTR interacting partners in plasma and present functions of interest such as molecular chaperone, and relate in several biological processes.

The execution of this work reinforces the involvement of non-genetic factor in the pathogenesis model of FAP.

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

2D	Electroforese Bidimensional
A25T	Substituição da alanina na posição 25 por treonina
ACN	Acetonitrilo
AD	do inglês, Alzheimer's Disease
AGEs	do inglês, <i>advanced glycation end products</i>
AGP	Argpirimidina
AM	Analísadores de massa
AP	do inglês, <i>alkaline phosphatase</i>
Apo-AI	Apolipoproteína-AI
Apo-J	Apolipoproteína-AJ
APS	Persulfato de amónio
AR	Aldose Reductase
AS PAF	Portadores heterozigóticos assintomáticos da mutação V30M da TTR
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
CHCA	do inglês, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
CID	do inglês, collision induced dissociation
CLTs	Portadores heterozigóticos sintomáticos da mutação V30M da TTR que receberam um fígado de cadáver <i>wild-type</i>
CSF	Fluido cerebrospinal
DHB	do inglês, <i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i>
DLT	Pacientes que receberam um fígado PAF por sofrerem de uma patologia hepática grave não relacionada
DTT	Ditiotreitol
FI	Fontes de ionização
FIB	Fibrinogénio
FT-ICR	do inglês, <i>Fourier-transform ion cyclotron resonance</i>

G6S	Substituição da glicina na posição 6 por serina
GAP	3-fosfato gliceraldeído
Glo 2	Glioxalase II
Glo1	Glioxalase II
GSH	Glutathione
HPR	do inglês, <i>Haptoglobin-Related Protein</i>
HRP	do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
IEF	do inglês <i>Isoelectric Focusing</i>
Ig	Imunoglobulina
IGF	do inglês, <i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBPs	do inglês, <i>Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins</i>
IGHM DP	do inglês, <i>Ig mu heavy chain disease protein</i>
IPG	do inglês, <i>immobilized pH gradients</i>
iPLA2- γ	do inglês, <i>Calcium-independent phospholipase A2-γ</i>
KO	do inglês, <i>knockout</i>
L55P	Substituição da leucina na posição 55 por uma prolina
L58H	Substituição da leucina na posição 58 por uma histidina
MALDI	do inglês, <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MAPK	do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	do inglês, <i>microchannel plate detectors</i>
MG-H	Hidroimidazolonas
MGO	Metilglioxal
MNV	Média dos volumes normalizados
MOLD	do inglês, <i>methylglyoxal-derived lysine dimer</i>
MS	Espectrometria de massa
ORF	do inglês, <i>open reading frames</i>

PAF	Polineuropatia Amiloidótica Familiar
PAFNT	Portadores heterozigóticos da mutação V30M da TTR com sintomas mas não transplantados
PCA	do inglês, <i>Principal components analysis</i>
PD	do inglês, Parkinson's Disease
PDGF	do inglês, <i>platelet-derived growth factor</i>
PMF	do inglês, <i>peptide mass fingerprinting</i>
RAGE	do inglês, <i>advanced glycation end-product receptor</i>
RBP	do inglês, <i>Retinol Binding Protein</i>
RE	Retículo endoplasmático
S50R	Substituição da serina na posição 50 por uma arginina
S52P	Substituição da serina na posição 52 por uma prolina
SA	do inglês, <i>sinapinic acid</i>
SDLG	S-D-lactoilglutatio
SDS-PAGE	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	do inglês, <i>secondary electron multipliers</i>
SNP	do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SSA	Amiloidose Senil Sistêmica
T119M	Substituição da treonina na posição 119 por uma metionina
T60A	Substituição da treonina na posição 60 por uma alanina
TBS	do inglês, <i>tris-buffered saline</i>
TEMED	O N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
THP	Tetraidropirimidina
TOF	do inglês, <i>Time-of-flight</i>
TTR	Transtirretina
V112I	Substituição da valina na posição 112 por isoleucina

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

V28N	Substituição da valina na posição 28 por asparagina
V30M	Substituição da valina na posição 30 por metionina
WT	do inglês, <i>wild-type</i>
Y90N	Substituição da tirosina na posição 90 por uma asparagina

LISTA DE TABELAS

TABELA II-1 - Descrição das amostras de plasma humano utilizadas durante o trabalho experimental.	30
TABELA II-2 - Composição dos géis de concentração e separação.	33
TABELA II-3 - Anticorpos primários e secundários utilizados nas detecções por Western blotting e diluições optimizadas utilizadas.	37
TABELA III-4 – Identificação da Transtirretina por PMF MALDI-FT-ICR MS: massa e sequência dos péptidos identificados nas amostras de plasma de Controlos, AS PAF, PAF, DLT e CLT, dentro da gama de valores de m/z de interesse.	56
TABELA III-5 – Quantificação relativa da TTR <i>wild-type</i> e V30M em amostras de plasma por PMF MALDI-FT-ICR MS: valores médios das razões efectuadas entre as intensidades monoisotópicas dos picos 1394.6178 e 1366.7556 m/z.	61
TABELA III-6 – Quantificação relativa das variantes <i>wild-type</i> e V30M da TTR em amostras de plasma por PMF MALDI-FT-ICR MS.....	61
TABELA III-7 – Identificação por espectrometria de massa das proteínas nos <i>spots</i> dos géis 2D assinalados como diferencialmente expressos.	70, 71
TABELA VII-8 – Concentração da proteína total em mg/mL nas amostras de plasma humano utilizadas ao longo do trabalho desenvolvido.	89
TABELA VII-9 – <i>Spots</i> identificados nos géis 2D de indivíduos controlo, assintomáticos (AS PAF) e doentes PAF (PAFNT) pelo SameSpots, ordenados em função do valor da ANOVA (<i>p-value</i> < 0,05).....	89 - 91
TABELA VII-10 – Processos biológicos potencialmente alterados e respectivas proteínas identificadas como diferencialmente expressas em portadores V30M assintomáticos e sintomáticos e controlos.	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I-1 – Transmissão autossómica dominante da PAF.	4
FIGURA I-2 – Sequência genómica que contém o gene para a TTR e respectivas sequências regulatórias.	6
FIGURA I-3 – Estrutura do tetrâmero TTR <i>wild-type</i> (A).....	7
FIGURA I-4 – Função da TTR.	9
FIGURA I-5 – Via de formação de fibras TTR.	12
FIGURA I-6 – Passos iniciais da reacção de Maillard para glicação proteica a partir da glucose.	19
FIGURA I-7 – AGEs proteicos formados pelo metilglioxal.	21
FIGURA I-8 – Sistema dos Glioxalases.	22
FIGURA I-9 –Transplante em dominó.	26
FIGURA II-10 – Instrumentos de separação electroforética vertical no formato de mini-gel.	32
FIGURA II-11 – Separação de proteínas num sistema SDS-PAGE descontínuo.....	33
FIGURA II-12 – Equipamento de <i>wet</i> -Western blotting.	35
FIGURA II-13 – Reacção entre o H ₂ O ₂ e o luminol, catalisada pelo HRP.	37
FIGURA II-14 – Estado de carga global de uma proteína a diferentes condições de pH em relação ao seu pl.	39
FIGURA II-15 – Aplicação da amostra no sarcófago e posicionamento da strip.	40
FIGURA II-16 – Componentes de um espectrómetro de massa.	42
FIGURA II-17 – Representação da ionização por MALDI.	44
FIGURA II-18 – Representação de um TOF equipado com um reflectrão.	45
FIGURA II-19 - Representação de uma célula de FT-ICR.	46
FIGURA III-20 – Concentração média da proteína total no plasma dos indivíduos não portadores de mutações conhecidas da TTR (controlos), portadores assintomáticos e sintomáticos da mutação V30M da TTR e pacientes transplantados com um fígado PAF (DLT) e com um fígado cadáver <i>wild-type</i> para a TTR (CLTs).	52
FIGURA III-21 – Análise das proteínas do plasma por SDS-PAGE, coloração com o Azul de Coomassie e Western blot do monómero da TTR e do sRAGE.	54
FIGURA III-22 – Análise comparativa da TTR monomérica e dimérica em géis SDS- PAGE.	55
FIGURA III-23 – Espectros da análise de PMF por MALDI-FT-ICR após digestão das	57

bandas de TTR das amostras de plasma.	
FIGURA III-24 – Sequência dos péptidos exclusivos da TTR <i>wild-type</i> , V30M e péptido comum a ambas as variantes – espectros de CID MSMS.	59
FIGURA III-25 – Análise por Western blot dos níveis de glicação derivada do Metilglioxal.	64
FIGURA III-26 – Comparação da expressão de algumas proteínas relacionadas com a glicação	66
FIGURA III-27 – Gráfico da análise PCAs (do inglês, <i>principal component analysis</i>) dos géis 2D de controlos, assintomáticos e doentes PAF não transplantados.....	68
FIGURA III-28 – Gel de electroforese bidimensional de indivíduo controlo utilizado como referência durante a análise realizada no SameSpots.	69
FIGURA III-29 – Processos biológicos com performance potencialmente alterada e diferencial em indivíduos assintomáticos e doentes PAF não transplantados relativamente a indivíduos saudáveis.	72
FIGURA III-30 – Número de vias em que participam as proteínas identificadas como diferencialmente expressas entre indivíduos controlo, assintomáticos e doentes PAF não transplantados.	73
FIGURA VII-31 – Gráfico da média das razões das intensidades monoisotópicas dos picos com m/z 1394.6178 e 1366.7556 nos grupos de controlos, indivíduos assintomáticos, doentes PAFNT e pacientes transplantados que receberam um fígado PAF (DLTs) ou doentes PAF que receberam um fígado cadáver <i>wild-type</i> (CLTs).	92
FIGURA VII-32 – Gráfico das razões das intensidades monoisotópicas relativas dos picos de m/z 1394.6178 e 1366.7556 em pacientes que receberam um fígado PAF (pacientes DLT) e um fígado de cadáver <i>wild-type</i> (pacientes CLT).	92

I - INTRODUÇÃO

Neste primeiro capítulo apresenta-se informação importante no contexto da PAF, focando aspectos que vão desde a descrição da patologia a nível clínico, como o seu modelo de patogénese molecular a factores não genéticos que se encontram relacionados com a mesma. O plano de trabalhos desenvolvido teve particular incidência sobre as diferenças existentes ao nível do proteoma entre indivíduos assintomáticos e indivíduos com apresentação clínica da PAF, ambos portadores de mutações amiloidogénicas da transtirretina, pelo que o breve estado da arte que se segue pretende uma contextualização adequada ao problema abordado no laboratório, a relevância que ele apresenta na problemática da PAF, assim como à abordagem escolhida para o estudar.

1 - Polineuropatia Amiloidótica Familiar

1.1 Das amiloidoses à Polineuropatia Amiloidótica Familiar: contexto histórico e epidemiologia

O termo genérico amiloide descreve um grupo de doenças em que se observa a perda de estrutura (em inglês *misfolding*) de proteínas, acompanhada de deposição extracelular de fibras amilóides (Ghiso et al. 1994). Para cada doença amiloide encontra-se associada uma proteína diferente. Apesar das diferentes sequências das proteínas envolvidas, existe um denominador comum que consiste na formação de fibras insolúveis com uma estrutura característica a partir da polimerização de qualquer um precursor proteico normalmente inócuo e solúvel (Sipe 1992). Este mecanismo, embora não totalmente elucidado, sabe-se que é um processo dinâmico e multifactorial, dada a ausência duma sequência e homologia estrutural comum a estas proteínas amiloidogénicas, que originam fibras amilóides *in vivo*.

Os depósitos de fibras amilóides apresentam duas características comuns: são insolúveis e resistentes à proteólise. As propriedades tintoriais e ópticas que detêm em comum, como a fluorescência com tioflavina e a afinidade selectiva para o vermelho do Congo com birrefringência verde após esta coloração (Ghiso et al. 1994), permitem a detecção e confirmação da presença de depósitos amilóides. Além destas características, observa-se uma estrutura secundária predominante em folhas β com uma orientação das proteínas perpendicular ao longo do eixo das fibras (Eanes & Glenner 1968), formando uma configuração β -pregueada (A. S. Cohen & Calkins 1959), que é independente da origem estrutural dos precursores.

De acordo com a localização dos depósitos, uma amiloidose pode ser classificada como localizada, quando atinge apenas um tecido ou órgão específico (como é o caso do cérebro na doença de Alzheimer), ou sistémica, afectando todo o organismo. As formas de expressão sistémica das amiloidoses são classificadas em três grupos distintos: primárias, secundárias e familiares ou hereditárias.

O tipo de amiloidose mais vulgar encontra-se na forma de amiloidose primária, caracterizada por uma linha anormal de células B da medula óssea que produzem a proteína amiloide - imunoglobulina de cadeia leve. Nas amiloidoses secundárias é necessária uma condição pré-existente (infecções crónicas, doenças inflamatórias) para a produção de uma proteína de fase aguda, a *serum amyloid A*, que leva à formação da fibra amiloide. Por último, a forma menos comum recai sobre as chamadas amiloidoses familiares, o único grupo onde a doença apresenta um carácter hereditário. A primeira observação deste tipo de amiloidose foi feita em 1952 por Corino de Andrade (Andrade 1952) que descreveu uma forma peculiar de neuropatia periférica na população do norte litoral de Portugal.

A amiloidose descrita por Corino de Andrade dá pelo nome de Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF), doença dos pezinhos ou Paramiloidose, e manifesta-se na terceira ou quarta década de vida. Os depósitos amilóides característicos, cujo principal componente é a proteína plasmática transtirretina (TTR) (P. P. Costa et al. 1978) ocorrem ao nível de vários órgãos e tecidos mas a principal característica desta patologia é a disfunção do sistema nervoso periférico, que causa uma neuropatia periférica senso-motora progressiva associada a desordens de origem autónoma. O coração, os vasos sanguíneos, rim e tracto digestivo também são atingidos, de forma significativa e variável conforme o tipo de PAF. Como consequência, esta doença neurodegenerativa é caracterizada por uma supressão da função dos órgãos afectados que mais tarde evolui para a perda de função. É portanto uma doença incapacitante, progressiva que afecta a qualidade de vida e resulta numa morte precoce, 10 a 20 anos após as primeiras manifestações clínicas (Holt et al. 1989).

Apesar da descrição formal da PAF e do seu carácter familiar em 1952, só em 1964 se estabeleceu o seu modo de transmissão autossómico e dominante (**Figura I-1**) (Becker et al. 1964). Após a descrição inicial, a caracterização de outras formas de apresentação clínica conduziu a uma primeira classificação das amiloidoses hereditárias em PAF Tipo I (Andrade ou tipo Português), Tipo II (Rukavina ou tipo Indiana) (Block et al. 1956), Tipo III (Van Allen ou tipo Iowa) (Van Allen et al. 1969) a que mais tarde se juntou a PAF Tipo IV (Meretoja ou tipo

Finlandês) (Meretoja 1973). Actualmente as Paramiloidoses são descritas em função da mutação que confere o carácter patogénico à TTR.

Detectada inicialmente apenas em famílias do norte litoral de Portugal, rapidamente se verificou que a Paramiloidose afecta mais do que uma região, identificando-se doentes com diferentes quadros clínicos consoante a sua localidade. Estas diferenças geográficas levantaram desde cedo a possibilidade de outros factores (quer genéticos, não genéticos ou ambientais) influírem na variabilidade da expressão clínica na PAF.

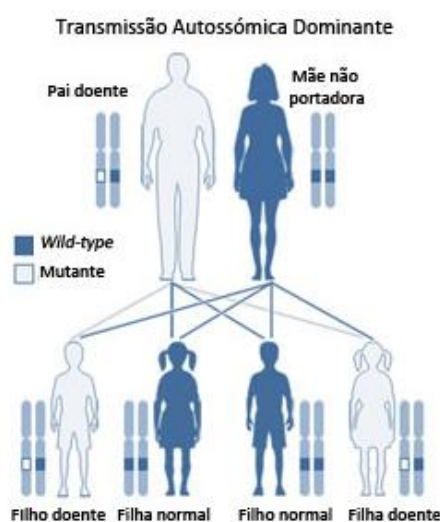


Figura I-1 – Transmissão autossómica dominante da PAF. Adaptado de (1).

Embora não tão comum como outras formas de amiloidose, a PAF é actualmente reconhecida como uma doença de ocorrência a nível mundial, com focos de maior incidência em Portugal, Suécia e Japão (Tawara et al. 1983; Shukuro Araki et al. 1968; Saraiva et al. 1983), o que veio trazer o reconhecimento do alargamento da doença, mas também da sua variabilidade fenotípica.

A mutação mais comum na PAF é a TTR V30M (em que a Valina na posição 30 é substituída por uma Metionina), a qual se encontra dispersa de forma esporádica a nível mundial, mas está principalmente associada às áreas endémicas de Portugal, Japão e Suécia (Saraiva et al. 1983; Tawara et al. 1983; Holmgren et al. 1988). Interessante que, ao contrário dos doentes suecos, doentes japoneses caracterizam-se por terem, regra geral, apresentação clínica, idade em que aparecem os primeiros sintomas (em inglês, *age onset*) e duração total sintomática muito semelhante à de doentes portugueses (Kito et al. 1980). Por outro lado, em áreas endémicas de Portugal a probabilidade de se ser portador é menor que na Suécia (0,18% vs 1,5%) (A Sousa et al. 1995; Holmgren et al. 1994), mas a penetrância de uma mutação é muito superior (87% dos portadores vs 5%) (A Sousa et al. 1993; Urban Hellman et al. 2008) e a

age onset mais precoce (33 vs 56 anos) (A Sousa et al. 1995; Holmgren et al. 1994), o que remete para uma incidência e prevalência em Portugal mais elevada, contrastando com a Suécia.

1.2 Sintomatologia

A PAF tem início já na fase adulta, em média aos $33,5 \pm 9,5$ anos de idade nos focos descritos para a doença (A Sousa et al. 1995). Os locais onde os depósitos de TTR mutante ocorrem determinam as manifestações clínicas da PAF (sousa 2001). Estas, juntamente com a predisposição para a deposição num determinado tecido ou órgão, parecem estar também relacionadas com o tipo de mutação amiloidogénica. Assim, as manifestações traduzem-se num conjunto de fenótipos heterogéneos, que incluem níveis diferentes de neuropatia, cardiomiopatia (Saraiva et al. 1990; Saraiva et al. 1992; F. Saito et al. 2001), síndrome do túnel cárpico (Izumoto et al. 1992), deposição de TTR no vítreo (F. Salvi et al. 1993; Zólyomi et al. 1998), e envolvimento leptomeníngeo (Petersen et al. 1997; Brett et al. 1999; Yazak et al. 2000).

Inicialmente, os sintomas são de origem sensitivo-motora e autónoma, mas o carácter progressivo da doença é predominante, acabando a neuropatia por evoluir. Sintomas cardiovasculares, gastrointestinais e oculares são as primeiras manifestações sistémicas que contribuem para a heterogeneidade fenotípica, podendo ocorrer de forma separada ou combinada (Luís 1978; Canijo & Andrade 1969). As disfunções genito-urinárias são também sintomas de neuropatia autónoma. Ao nível sensitivo, a perda de sensibilidade térmica e algica dos membros inferiores é a primeira forma de apresentação clínica, que progride de forma ascendente (Dyck & Lambert 1968). Acompanham-se as parestesias e disestesias que contribuem para complicações como úlceras perfurantes e deterioração das articulações (articulações de Charcot). A neuropatia motora, reflecte-se em paresias que evoluem de forma semelhante à neuropatia sensitiva, ou seja, de forma ascendente. A morte surge, na história natural da doença, 10 a 20 anos após as primeiras manifestações clínicas.

2 – A PAF e a Transtirretina: do gene à proteína

2.1 O gene e a expressão de TTR

Em humanos, a TTR é uma proteína codificada por um gene (**Figura I-2**) localizado no cromossoma 18 (18q11.2-q12.1) (A. S. Whitehead et al. 1984) que possuiu 4 exões numa sequência genómica de 7 kb. O primeiro exão codifica a sequência líder e os três primeiros aminoácidos, mas a maioria da proteína está codificada nos exões 2, 3 e 4. Além da sequência codificante da proteína funcional, o gene contém ainda duas *open reading frames* (ORFs), uma no segundo intrão e outra no terceiro (Tsuzuki et al. 1985), sendo ambas transcritas de forma dependente do transcrito primário. Não codificam para proteínas (Miguel Luz Soares et al. 2003) e a sua função permanece desconhecida.

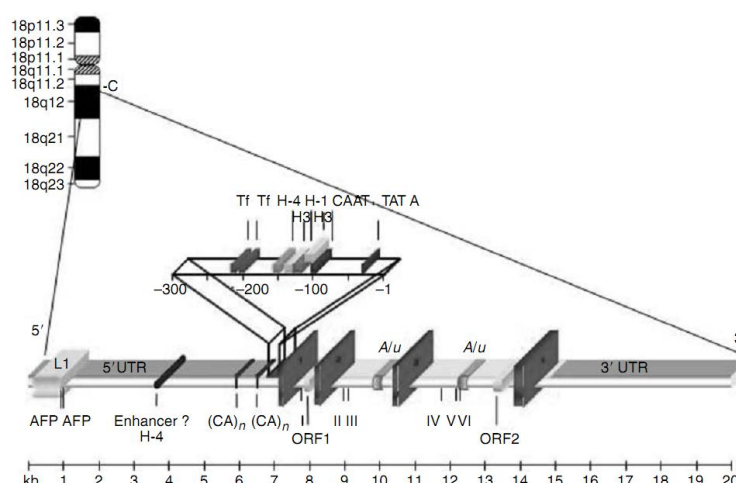


Figura I-2 – Sequência genómica que contém o gene para a TTR e respectivas sequências regulatórias. SNPs (*single nucleotide polymorphism*) numerados de I a VI. Exões numerados de 1 a 4. AFP: *binding site for AFP-1 factor*. (CA)_n: *CA-dinucleotide repeats*. Adaptado de (Sakaki et al. 1989).

Estão presentes seis SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*) na estrutura do gene, entre exões e intrões (Yoshioka et al. 1989), mas foram também identificados SNPs e marcadores de microssatélites na região não codificante (M L Soares et al. 2004). Apesar de não ser conhecida a função destes últimos SNPs, são úteis como marcadores genéticos para a identificação cromossómica de mutações, permitindo identificar a sua origem e nalguns casos o fluxo geográfico percorrido por um gene com uma mutação amiloidogénica, como a mutação V30M (Reilly et al. 1995). A tradução do mRNA de TTR é realizada em polirribossomas associados à membrana do retículo endoplasmático (RE), sendo a clivagem da sequência líder a única modificação significativa que sofre. A formação do tetrâmero ocorre também ao nível do RE e varia conforme o tipo de célula (Melhus et al. 1991; Bellovino et al. 1998; Bellovino et al. 1996).

A TTR é maioritariamente expressa no fígado (Dickson, Aldred, et al. 1985) e, para além deste, é também expressa em menor quantidade no plexo coróide e retina (D. R. Soprano et al. 1985; Herbert et al. 1986; Getz et al. 1999). Encontra-se portanto presente no plasma e no fluido cerebroespinal (CSF), do qual faz parte como um dos principais componentes e também como o mais abundante (Dickson, Howlett, et al. 1985). Foram ainda detectadas pequenas quantidades do mensageiro de TTR e da própria proteína no pâncreas (Jacobsson et al. 1989), cuja origem provém essencialmente das células α (Refai et al. 2005).

A concentração sérica de TTR varia entre 170 e 420 $\mu\text{g/mL}$ e no fluido cerebroespinal entre 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$ (Vatassery et al. 1991). Tal como sucede com outras proteínas amiloidogénicas, a TTR apresenta um tempo de meia-vida em circulação muito baixo ($t_{1/2} = 1.5\text{-}2\text{dias}$), sendo principalmente degradada no fígado (Makover et al. 1988).

2.2 A proteína

A Transtirretina é uma proteína plasmática, originalmente designada por pré-Albumina, que circula na forma de tetrâmero. A sua forma homotetramérica com 54,980 kDa (Van Jaarsveld et al. 1973) – 4 subunidades idênticas de 14 kDa – foi confirmada após a determinação da sua sequência de aminoácidos (Kanda et al. 1974), obtendo-se a primeira estrutura cristalina em 1977 (Blake et al. 1978; Blake & Oatley 1977). Cada subunidade do tetrâmero é composta por 127 resíduos de aminoácidos, com um único resíduo de cisteína que não participa na formação de ligações persulfureto. As duas folhas β presentes em cada monómero são compostas pelas cadeias DAGH e CBEF, que interagem através de ligações de hidrogénio entre as cadeias HH' e FF' para formar um dímero (**Figura I-3**). São as ligações de hidrogénio existentes entre o *loop* AB de um monómero e a cadeia H' de outro, bem como as interações hidrófobas, que mantêm a estrutura tetramérica da TTR (Saraiva 2001).

Em 1997, Richardson e Schreiber examinaram a sequência de aminoácidos de 22 espécies diferentes da TTR. Observaram que as regiões compreendendo os aminoácidos de 10 a 22 e 106 a 121, além de serem as mais conservadas, correspondem aos locais envolvidos na ligação à hormona tireóidea, tiroxina (T4) (Schreiber & S J Richardson 1997), um canal que é formado pela associação dos 4 monómeros (Blake et al. 1974). Nos locais de ligação à proteína RBP (do inglês, *Retinol-binding-protein*) (resíduos 83-85, 99 e 100) a conservação era menor, mas as regiões mais variáveis correspondiam aos terminais carboxilo e amina (resíduos 1 a 10 e 123 a 127).

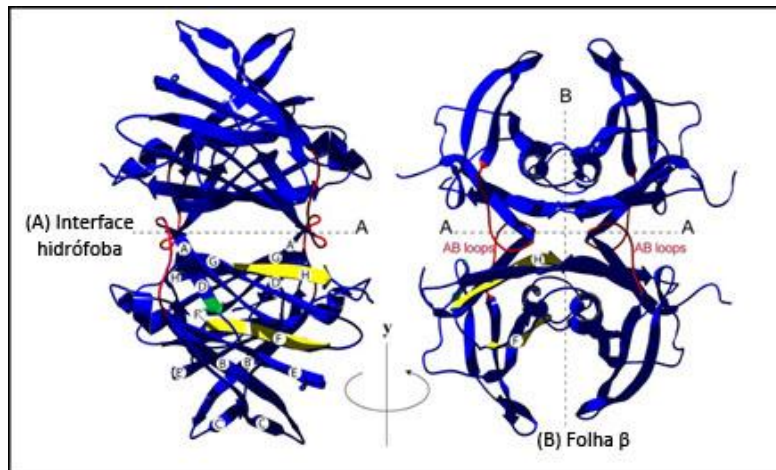


Figura I-3 – Estrutura do tetrâmero TTR *wild-type* (A) e rotação de 90° da estrutura (B). As linhas a tracejado indicam as superfícies hidrófobas e folhas β . Os resíduos que participam na formação da interface hidrófoba estão destacados a vermelho e as cadeias H e F, que formam as ligações de H necessárias para estabilizar as folhas β , estão marcadas a amarelo. O resíduo Leu55 está assinalado a verde num dos monómeros. Adaptado de (Keetch et al. 2005).

Embora existam dados relacionados com a velocidade de permuta *in vitro* de subunidades entre tetrâmeros recombinantes *wild-type* e mutante (P Hammarström et al. 2001), não existe informação no que toca às quantidades relativas das subunidades mutantes e *wild-type* nos tetrâmeros formados *in vivo*. Assim, o *pool* de TTR circulante pode consistir numa mistura de tetrâmeros com uma composição variável de monómeros ou pode conter duas populações, formada cada uma com um tipo de subunidade monomérica. No entanto, dado o efeito destabilizante que algumas variantes apresentam, esta última hipótese parece ser menos provável.

2.3 Função da TTR

A TTR é sobretudo reconhecida pela sua função de transporte de hormonas e proteínas no plasma, especificamente a hormona tiróidea T4 e o retinol associado à proteína RBP (do inglês, *retinol binding protein*).

Mais de 99% das hormonas da tiróide circulantes estão ligadas a proteínas plasmáticas, como a TBG, TTR e a albumina. No entanto, embora em humanos a TTR transporte apenas 15% da T4 plasmática total, no CSF representa o maior transportador desta hormona (Bartalena & Robbins 1993).

Como transportador de retinol, a TTR liga-se ao complexo RBP-retinol ainda no retículo endoplasmático (RE) (Raz et al. 1970), impedindo que este complexo seja removido por filtração glomerular ao nível do rim (Noy et al. 1992), pelo que a concentração de RBP em

circulação depende do nível de TTR e da disponibilidade de retinol (Buxbaum 2007). Embora tenha sido especulado a possibilidade da TTR desempenhar um papel de reservatório para o retinol, foi comprovado que a TTR não intervém na sua absorção: através da ligação da proteína RBP a um receptor membranar, o retinol é transferido para uma proteína RBP intracelular sem intervenção da TTR (Sundaram et al. 1998).

Para além das suas funções de transporte, pouca atenção tem sido prestada a outros papéis que a TTR pode desempenhar no organismo. No entanto, tem vindo a aumentar a percepção de que a TTR é mais do que um simples transportador. Recentemente foi demonstrado que ratos KO (do inglês, *knockout*) para a TTR apresentam disfunções na memória espacial de referência e na aprendizagem espacial em comparação com animais *wild-type* com a mesma idade (J. C. Sousa et al. 2007). Além disso estes ratos mostraram uma perda de memória menos acentuada com o aumento da idade, mas sem diferenças entre ratos TTR KO e *wild-type* envelhecidos (J. C. Sousa et al. 2007). Estes resultados apontam para uma função comportamental da TTR, cuja ausência acelera o pior desempenho cognitivo habitualmente associado a um envelhecimento normal.

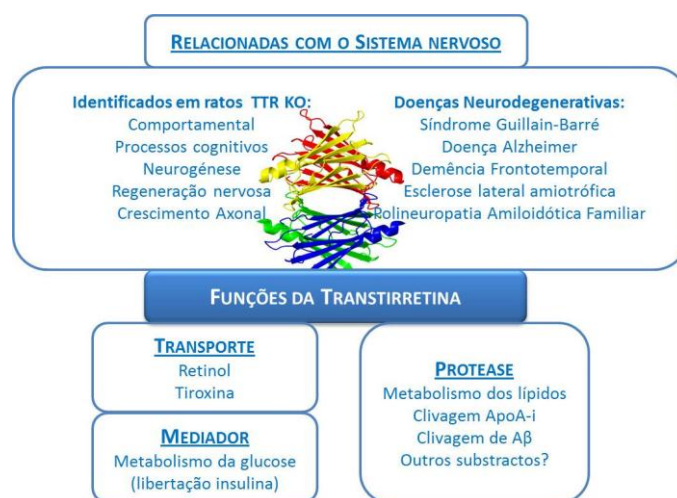


Figura I-4 – Funções da TTR. Adaptado (Fleming et al. 2009).

Uma pequena fracção da TTR plasmática está associada a lipoproteínas de baixa e elevada densidade (Y. Tanaka et al. 1994), tendo sido demonstrado que a associação às últimas dá-se por meio da apolipoproteína A-I (Apo-AI). Quando esta interacção foi dissecada, observou-se que a TTR apresenta uma actividade de protease, capaz de hidrolisar o terminal carboxilo da Apo-AI (Liz et al. 2004). Dada a importância deste terminal na ligação de lípidos e no efluxo de colesterol, é espectável o envolvimento da TTR no metabolismo lipídico. Esta actividade proteolítica da TTR recentemente descrita é ainda relevante para outras funções,

como a sua participação no metabolismo de neuropéptidos e a sua capacidade para promover a regeneração nervosa (Liz et al. 2009).

Além da presença no metabolismo de neuropéptidos e lípidos, foi também mostrado que a TTR afecta a absorção de glucose pelas células. Como foi dito anteriormente, o pâncreas apresenta uma pequena produção de TTR (em particular por células- α), cuja produção é aumentada em condições pós-prandiais. Esta produção de TTR vai estimular a libertação de insulina, que por sua vez acelera a absorção de glucose (Refai et al. 2005; S.-X. Zhang et al. 2010). Na **Figura I-4** mostram-se algumas funções da TTR.

2.4 Mutações e amiloidogenecidade

A mutação amiloidogénica mais comum no gene da TTR como causa da PAF a nível mundial é aquela que dá origem à variante V30M, onde ocorre uma substituição de uma valina por uma metionina na posição 30 (Saraiva et al. 1984). Existem no entanto, outras mutações patogénicas frequentes, como a V122I, a T60A e a L58H. Em Portugal, para além da V30M, estão identificadas outras mutações de carácter amiloidogénico como a S50R, a V28M e a S52P, e não amiloidogénicas as G6S, Y90N e T119M. Estas últimas, sendo mais estáveis que a própria TTR *wild-type*, como a T119M, suprimem a expressão da doença *in vivo* em indivíduos heterozigóticos que apresentam mutação patogénica (T. Coelho et al. 1996; Sekijima et al. 2003; Per Hammarström et al. 2003).

Até à data, foram descritas mais de 100 mutações na TTR com carácter amiloidogénico, isto é, associadas à deposição de amiloide (Lawreen Heller Connors et al. 2003). Todas, à excepção da deleção de um aminoácido na posição 122, resultam de mutações pontuais na cadeia polipeptídica, e apenas 3 das substituições ocorrem em “*hot spots*” mutacionais (regiões do DNA onde se observam mutações com maior frequência), nos dinucleótidos CpG (Cooper & Youssoufian 1988). A maioria dos pacientes com PAF é heterozigótica e por isso produz uma cópia da TTR *wild-type* e uma cópia da variante amiloidogénica. Nestes indivíduos, as taxas de transcrição e tradução de ambos os alelos (variante normal e mutada) parecem ser iguais.

A análise por cristalografia de raio-X de variantes mutadas permitiu compreender que as estruturas tridimensionais das proteínas são bastante semelhantes. No caso da mutação V30M, observa-se apenas um aumento da distância entre as folhas β , o que provoca uma distorção da cavidade responsável pela ligação à tiroxina (Hamilton et al. 1993) e exposição do

resíduo 10 ao solvente (Terry et al. 1993). Por outro lado, a identificação de uma variante da TTR que resulta da substituição de um resíduo de prolina por um de leucina na posição 55 da cadeia polipeptídica (Jacobson et al. 1992), veio mostrar uma variante muito mais agressiva que a V30M, que destrói as ligações de hidrogénio entre as cadeias D e A (Sebastião et al. 1998). Experiências de Bonifácio e colaboradores sugerem que a TTR L55P já se encontra numa conformação amiloidogénica, formando imediatamente fibras amilóides, o que justifica a sua maior agressividade (Bonifácio et al. 1996).

Algumas mutações associadas à PAF são clinicamente indistinguíveis da descrição inicial da doença (Toyooka et al. 1995; D. R. Booth et al. 1998; Misrahi et al. 1998; de Carvalho et al. 2000), embora outras se traduzam em fenótipos heterogêneos variáveis e numa predisposição preferencial para afectar um determinado tecido ou órgão. Assim, o conhecimento de uma dada mutação adquirida não permite prever os sintomas da PAF, devido à extensa variedade clínica que se faz acompanhar e à possibilidade de ainda não se encontrarem descritos alguns sintomas associados à Paramiloidose.

2.5 Patogénese: os modelos de agregação TTR

Actualmente, o modelo melhor aceite para descrever a patogénese desta doença, baseado em estudos *in vitro*, assenta na perda de estabilidade do tetrâmero da TTR devido à ocorrência de mutações pontuais, que levam à sua dissociação em monómeros, agregação e consequente formação de fibras amilóides de TTR (Hurshman et al. 2004; Bonifácio et al. 1996; Sebastião et al. 1998). A agregação dá-se por um processo de polimerização em “*downhill*” (cascata), onde se formam oligómeros, agregados solúveis, agregados amorfos insolúveis e finalmente fibras amilóides (Hurshman et al. 2004; Lawreen Heller Connors et al. 2003; Quintas et al. 2001; Saraiva 2001) (**Figura I-5**). Do ponto de vista energético, estas espécies (fibras) constituem a forma mais estável dos monómeros *misfolded* (Hurshman et al. 2004). O processo de *self-assembly* dos intermediários amiloidogénicos é um processo dependente da concentração e do tempo (Estrada & Soto 2007; J. E. Kang et al. 2009), logo, de acordo com o modelo de polimerização dependente da nucleação a agregação não ocorre enquanto a concentração da proteína amiloidogénica não ultrapassar um determinado nível (J. E. Kang et al. 2009).

Inicialmente foi proposto por Kelly e Colon que os lisossomas seriam os organitos responsáveis pela desnaturação parcial da TTR, dando origem a um intermediário

amiloidogénico parcialmente desnaturado que seria por si só suficiente para originar as fibras amilóides (Colon & J W Kelly 1992). Os lisossomas, responsáveis pelo *turnover* de proteínas através da desnaturação ácida seguida de proteólise, induziriam o rearranjo e dissociação do tetrâmero com o seu baixo pH, e a instabilidade das variantes de TTR correlacionar-se-ia com a agressividade de cada mutação (McCutchen et al. 1993). Na base deste pressuposto esteve a demonstração de que variantes mais patogénicas, como a L55P, apresentam uma estabilidade significativamente menor em relação à TTR *wild-type* e uma capacidade de desnaturar formando intermediários amiloidogénicos a valores de pH intermédios, enquanto uma variante menos agressiva como a V30M requer um pH mais ácido para que a sua desnaturação seja induzida (pH 5.0 vs 6.15) (McCutchen et al. 1993). Por outro lado, a existência de uma variante não amiloidogénica mais estável que a *wild-type*, a T119M, veio mostrar que duplos mutantes V30M/T119M são estabilizados por esta última mutação, que confere maior resistência à desnaturação ácida e diminui a amiloidogenecidade da V30M (McCutchen et al. 1995). Porém, o mecanismo proposto por Kelly para a formação das fibras amilóides, que visava a dissociação da TTR tetramérica em monómero por um processo dependente do pH e da concentração de proteína, implica que a formação dos depósitos ocorra intracelularmente, o que não é consistente com as observações dos depósitos de TTR a nível extracelular (Adams & Said 1996).

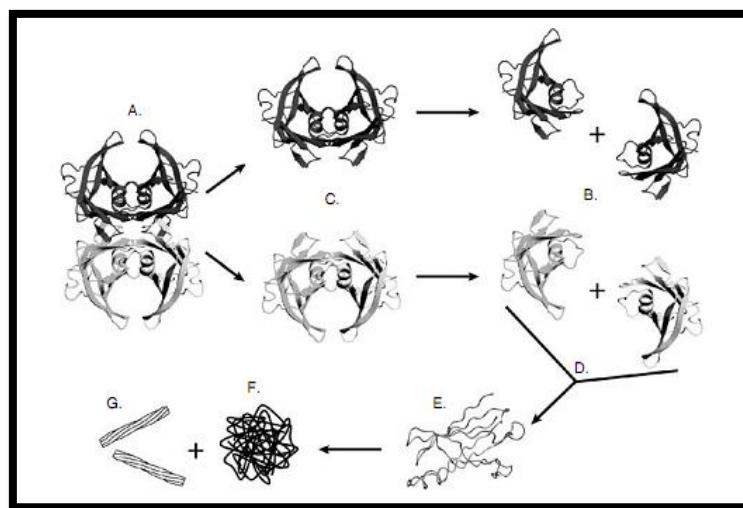


Figura I-5 – Via de formação de fibras TTR. Em condições fisiológicas a TTR existe como tetrâmero (A) em equilíbrio com os seus monómeros (B) através de um estado dimérico hipotético (C). Após a sua libertação, dá-se o *misfolding* dos monómeros (D), que rapidamente agrega para formar oligómeros (E), agregados amorfos insolúveis (F) e fibras (G). A propensão do monómero para o *misfolding* é aumentada pela presença de mutações amiloidogénicas. Adaptado de (Foss et al. 2005).

Quintas desenvolveu um modelo diferente para a formação das fibras amilóides de TTR. Foi a observação dos depósitos amilóides predominantemente nos nervos periféricos e da

dissociação do tetrâmero de TTR em espécies monoméricas não nativas a pH 7 e em condições de força iónica fisiológicas que o levou a contrariar a hipótese de que os lisossomas seriam essenciais para a sua formação (Quintas et al. 1997). Assim, foi proposto um modelo de formação de fibras amilóides baseado na dissociação da proteína tetramérica em condições fisiológicas, onde a exposição da superfície hidrófoba dos monómeros ao solvente se apresenta como principal factor (Quintas et al. 1999). De acordo com este modelo foi demonstrado que a dissociação do tetrâmero (primeiro e mais importante passo) e a desnaturação parcial do monómero precede a formação das fibras amilóides (Quintas et al. 2001) (**Figura I-5**). A presença de uma mutação vai influenciar o equilíbrio que existe entre as espécies tetramérica e monoméricas, onde variantes mais amiloidogénicas favorecem a formação do monómero não nativo (que é menos estável) com maior tendência para formar o intermediário monomérico *misfolded*.

Apesar da coexistência de fibras amilóides e agregados amorfos de origem desconhecida ter sido descrita há cerca de 40 anos, a deposição de TTR sob a forma de pequenos agregados não fibrilares ocorrendo antes da formação de amiloide só foi demonstrada em 2001 (M. M. Sousa, Cardoso, et al. 2001). Sousa *et al.* testaram os nervos de portadores assintomáticos da TTR V30M para a deposição e presença de fibras amiloide por imunohistoquímica e coloração com vermelho do Congo. Nestes nervos a TTR já se encontrava depositada sob uma forma agregada não fibrilar, logo negativa para a coloração com o vermelho do Congo (M. M. Sousa, Cardoso, et al. 2001). Ao estudar-se a natureza do material depositado, concluiu-se que se tratavam de pequenos agregados amorfos presentes nos nervos PAF antes das fibras serem visíveis, mas que continuam presentes em estádios mais tardios da progressão da PAF, coexistindo com fibras bem estruturadas e maduras. Este possível papel patogénico dos agregados não fibrilares é realçado quando mais tarde se demonstrou que as fibras maduras de TTR não são capazes de causar danos celulares, mas que os agregados de TTR são tóxicos para as células (K. Andersson et al. 2002). O facto dos nervos PAF com agregados de TTR depositados mas ausência de fibras apresentarem sinais de *stress* oxidativo (Y. Ando et al. 1997; K. Andersson et al. 2002) e inflamatório (M. M. Sousa, S. Du Yan, et al. 2001) levantou a hipótese dos agregados tóxicos terem o potencial de induzir alterações neurodegenerativas (M. M. Sousa, Cardoso, et al. 2001) e das fibras maduras de TTR encontradas nos nervos dos doentes PAF representarem um estágio final inerte.

Embora tenham sido realizados vários ensaios cinéticos e termodinâmicos em proteínas recombinantes de TTR formando híbridos entre as formas *wild-type* e mutante (ex: V30M), onde se observou que a presença da mutação desvia o equilíbrio tetrâmero-

monómero para a forma monomérica (Hurshman et al. 2004; Schneider et al. 2001), o mecanismo subjacente à formação de fibras amilóides de TTR ainda não se encontra totalmente elucidado. Mesmo suportando as premissas do modelo de agregação, a maioria dos ensaios para estudar o processo de formação de fibras é realizada *in vitro* e afastada das condições fisiológicas. Além disso, o próprio modelo enunciando não permite prever e compreender a variabilidade fenotípica que está associada à PAF, como as diferentes *age onset*, os níveis de penetrância entre indivíduos portadores da mesma mutação, homo e heterozigóticos, pontos que mais tarde serão abordados em maior detalhe.

As mutações não podem, portanto, ser o único factor por detrás da patogénese da PAF, responsáveis por destabilizar a estrutura tetramérica da TTR, promover a sua agregação e deposição sob a forma amilóide. Devem existir outras condições que, directa ou indirectamente, influenciam a progressão da Paramiloidose, como por exemplo a glicação. Esta modificação está presente em várias doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Vitek et al. 1994; Castellani et al. 1996). Na PAF também se encontraram provas da presença de AGEs (do inglês, *advanced glycation end products*), quando em 2005 Gomes *et al.* identificaram e quantificaram um produto específico de glicação por metilglioxal, a Argpirimidina, dos depósitos amilóides de doentes PAF (Gomes et al. 2005). Dada a importância da glicação face a estas descobertas, será dedicado um capítulo para desenvolver com maior detalhe o seu papel na PAF.

2.6 Patofisiologia: toxicidade induzida

Os mecanismos moleculares de morte celular na PAF ainda não são totalmente conhecidos, mas várias observações apontam para a toxicidade dos agregados não fibrilares como um mecanismo comum às doenças amilóides (Bucciantini et al. 2002). Tendo em conta os dados existentes até à data, o mecanismo provável para a morte neuronal associada à PAF será espoletado pela interacção de agregados de TTR com receptores celulares que conduz ao aumento da expressão de moléculas relacionadas com o *stress* oxidativo e inflamatório.

Alguns destes processos foram já identificados, como a diminuição da actividade mitocondrial, a alteração da sinalização mediada pelo cinase MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) a activação de caspases e indução de *stress* no RE (Reixach et al. 2004; F. A. Monteiro et al. 2006). Todas estas respostas são mediadas por receptores, como o RAGE (do inglês, *advanced glycation end-product receptor*), que foi descrito como receptor de

moléculas precursoras de fibras amilóides bem como agregados de TTR (Bucciarelli et al. 2002). Sabe-se que este receptor desencadeia mecanismos de transdução de sinal que resultam em respostas inflamatórias através da regulação do factor NF-kB (factor nuclear de transcrição) e da sinalização da via MAPK (Ding & Keller 2005), por exemplo. Em 2000 este receptor foi relacionado com a PAF, tendo sido reportado um aumento da sua expressão a nível membranar, mas não da sua forma livre em circulação, com a progressão da doença (M. M. Sousa, S. Du Yan, et al. 2000).

É necessário aprofundar o conhecimento das cascatas de sinalização envolvidas na toxicidade mediada pelos agregados não fibrilares, para a compreensão da patologia associada à PAF e ainda de outras doenças neurodegenerativas relacionadas com a deposição de fibras amilóide.

2.7 A heterogeneidade fenotípica: a importância de biomarcadores, dos estados assintomáticos e da quantificação da TTR em circulação

Conforme já mencionado anteriormente, a maioria dos indivíduos paramiloidóticos são portadores heterozigóticos de uma certa variante, na sua maioria V30M. No entanto, como está associada a um carácter autossómico dominante uma mutação num dos alelos é suficiente para a manifestação de fenótipo patogénico. Dentro desta população de indivíduos, quer de origem portuguesa, japonesa ou sueca, observa-se uma grande heterogeneidade fenotípica, como diferentes níveis de penetrância exibidos pelos seus portadores, antecipações e/ou atrasos da *age onset*. O porquê destas diferenças fenotípicas ainda não encontra explicação, e o modelo de agregação da TTR - actualmente mais aceite para explicar a patogénese da PAF - não permite prever ou compreender estes fenómenos não característicos de uma doença autossómica dominante.

No que toca à *age onset*, embora tenha sido definida uma idade média para a manifestação dos primeiros sintomas clínicos, este valor apresenta uma grande inconstância entre portadores de uma mesma mutação e de mutações diferentes. Não é possível ter uma noção exacta da extensão da sua variabilidade em paramiloidóticos: sabe-se que pode variar décadas em indivíduos portadores e que não existe consistência entre populações de origem étnica diferente, sendo a concordância maior em indivíduos pertencentes a uma mesma família. Em gémeos homozigóticos seria de esperar que o início da doença se desse

simultaneamente, mas observou-se que a *age onset* também pode variar nestes portadores de variantes TTR patogénicas (Munar-Qués et al. 1999).

Por outro lado, seria espectável que, segundo o modelo de agregação estabelecido *in vitro* em que a formação de fibras se deve à perda de estabilidade, indivíduos homozigóticos para uma mutação apresentassem um quadro clínico mais severo do que pacientes com a produção de apenas uma cópia do alelo mutado. Tal não acontece, ou seja, portadores homozigóticos não apresentam uma forma mais severa da doença (Koike et al. 2009; M. Tanaka et al. 1988), e alguns indivíduos (hetero e homozigóticos) permanecem assintomáticos ao longo da sua vida (Rudolph et al. 2008).

Outro exemplo incontestável da variabilidade fenotípica da PAF é a agressividade que diferentes mutações apresentam devido aos efeitos que se verificam ao nível da estabilidade do tetrâmero. Sabe-se que a variante L55P, por ter um maior efeito destabilizante que a V30M na forma tetramérica da TTR e por se apresentar já numa conformação amiloidogénica, resulta numa forma muito mais agressiva de Paramiloidose. No entanto, existe ainda outra variante que se apresenta como a mais destabilizante da TTR: a A25T (Sekijima et al. 2003). Surpreendentemente, os sintomas clínicos em doentes portadores desta mutação aparecem mais tarde do que em portadores da variante V30M (Sekijima et al. 2003). Assim, conclui-se que a mera presença de uma mutação e o seu grau de patogenicidade (em função da destabilização que causa no tetrâmero) não são suficientes para explicar as diferenças observadas em pacientes com a mesma mutação em diferentes partes do mundo, ou mesmo as diferenças dos quadros clínicos que diferentes mutações apresentam.

Com o objectivo de justificar as diferenças entre as populações portuguesa e sueca portadoras da mutação V30M, Olsson *et al.* (Olsson et al. 2010) propuseram que os portadores suecos teriam uma menor quantidade relativa da variante mutada em circulação que os primeiros, e por isso um fenótipo no geral menos agressivo. Esta hipótese, não verificada experimentalmente, baseia-se no facto de que os processos de agregação proteica e formação de fibras amilóides são considerados dependentes da concentração. Será então fundamental determinar a quantidade relativa entre as variantes *wild-type* e mutada da TTR, uma vez que a maioria dos pacientes com Paramiloidose são heterozigóticos. O estudo da progressão da PAF em função da quantidade de TTR mutada em circulação é de extrema relevância pois, segundo o modelo de amiloidogénese, com a progressão clínica da PAF dever-se-ia acompanhar um aumento da variante V30M. É neste aspecto que se destacam também os indivíduos num estado assintomático, indispensáveis para que seja possível avaliar a

quantidade das formas de TTR ao longo do desenvolvimento desta condição. A não verificação de uma alteração da proporção das variantes de TTR entre assintomáticos, indivíduos com expressão clínica da PAF e indivíduos saudáveis irá contestar o modelo de patogénese actualmente aceite e reforçar a necessidade de procura de um modelo mais completo e conciso que reflecta o envolvimento dos vários intervenientes na PAF.

Para além da determinação da razão das formas de TTR em circulação, o estudo de indivíduos assintomáticos deverá ser ainda considerado para perscrutar as diferenças fenotípicas que foram descritas e o que as causa. Espera-se que o foco de estudo incida sobre a perspectiva dos factores desconhecidos, podendo ser ou não de carácter genético, que levam a uma diferenciação entre indivíduos que supostamente apresentam a mesma predisposição genética para esta doença. Explorar quais os factores, para além da mutação, que são determinantes na PAF permitirá preencher a falta que um conhecimento mais aprofundado do mecanismo patogénico por detrás desta doença faz para que novas abordagens terapêuticas possam surgir, assim como a identificação de biomarcadores para a determinação do estado de progressão da patologia.

A primeira ligação entre a TTR e a doença de Alzheimer (AD) surgiu quando se observaram níveis significativamente diminuídos (cerca de 1,2 vezes) de TTR no CSF de doentes com AD (Elovaara et al. 1986; Serot et al. 1997), tendo sido estabelecida uma correlação negativa da TTR no CSF com o grau de demência na AD (Riisøen 1988). Estes dados destacaram a TTR como possível biomarcador da patologia de Alzheimer, e reforçaram a importância da quantificação relativa da TTR em circulação de doentes não apenas com AD, mas também PAF.

3 – A TTR e outras doenças neurodegenerativas

3.1 Amiloidose Senil Sistémica (SSA)

Para além da PAF, a TTR está também implicada noutras doenças de carácter neurodegenerativo. Uma delas é a Amiloidose Senil Sistémica (SSA), associada à ausência de mutações pontuais na TTR, com deposição de fibras amilóides compostas por TTR *wild-type* (M. D. Benson 1989; P Westermark et al. 1990) e a um aparecimento mais tardio das manifestações clínicas (Jacobson et al. 1992). Numa análise dos depósitos cardíacos de pacientes suecos com SSA, encontrou-se TTR *wild-type* numa forma truncada, o que levantou a hipótese do mecanismo de deposição da proteína não mutada ser diferente das variantes

amiloidogénicas (Bergström et al. 2005). No entanto, em ratos transgénicos, os depósitos cardíacos apresentaram apenas a proteína na sua forma intacta (Teng et al. 2001). Estes resultados podem dever-se a uma diferença de espécies, ou ao facto da proteína ser sobreexpressa acima dos níveis normais, não sendo necessária uma digestão prévia para agregar. No entanto, não existem estudos, quer *in vitro* ou *in vivo*, que suportem esta afirmação ou uma possível predisposição geneticamente determinada para a digestão da TTR em formas pró-fibrilares, em que a presença de mutações pontuais na TTR pudesse tornar a proteína mais susceptível a este processo, logo amiloidogénica.

Por outro lado, a ocorrência dos depósitos amilóides *wild-type in vivo* sugere a existência de um mecanismo comum para a conversão de TTR solúvel em TTR amilóide insolúvel. As mutações pontuais que ocorrem na TTR tornam-na mais amiloidogénica, visto que os primeiros sintomas da PAF ocorrem muito mais cedo que na SSA: entre os 30 e 40 vs 80 anos de idade.

Esta doença vem realçar o carácter intrinsecamente amiloidogénico que a TTR possui, dada a associação da forma *wild-type* a depósitos amilóides, que parece ocorrer de forma “natural” e a par com a maturidade/envelhecimento. Nesta perspectiva, as mutações vêm agravar os fenómenos de agregação e deposição, mas ainda não se conhecem quais as condições que “naturalmente” favorecem o carácter patogénico da proteína não mutada. Tão pouco se consegue explicar as condições em que ocorre a destabilização de um tetrâmero composto apenas por proteína *wild-type*, considerando que o modelo molecular de patogénese tinha por base uma mutação destabilizante. Porém, especula-se que possam estar relacionados por exemplo com a presença de AGEs, uma vez que estes apresentam uma acumulação ao longo da vida, sendo detectados especialmente na população envelhecida. A presença de AGEs, detectada nos depósitos amilóides de TTR na PAF, poderá representar um de muitos *triggers* que, na presença de uma mutação, favorecem o carácter amiloidogénico da proteína TTR.

4 - A glicação proteica

A glicação de proteínas é uma modificação pós-traducional irreversível, onde os grupos amina das cadeias laterais de argininas e lisinas reagem com compostos com grupos carbonilo, dando origem a produtos avançados de glicação (AGEs). Esta modificação é equivalente a uma mutação pontual, afectando a estrutura, estabilidade e função proteica. A formação de AGEs em proteínas tem sido implicada em diversas complicações patológicas, como a Diabetes

Mellitus (Brownlee 1995), cataratas (Lyons et al. 1991), doenças relacionadas com o envelhecimento e neurodegenerativas do tipo amilóide. Encontram-se proteínas glicadas nos depósitos amilóides da Doença de Alzheimer (F. Chen et al. 2004), nos corpos de Lewy na Doença de Parkinson (Castellani et al. 1996) e nos depósitos de TTR amilóide na PAF (Gomes et al. 2005). A estrutura em folhas β das fibras e a presença de AGEs são características comuns em todas as patologias amilóide, o que sugere um possível papel da glicação na formação e patogénese amilóide.

4.1 Conceitos gerais

A glicação é um processo que afecta diversas biomoléculas como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Thorpe & Baynes 1996; Baynes & Thorpe 1999; Thornalley 2008). A glicação é o resultado da reacção de Maillard e ambos os termos são utilizados para referir o conjunto de reacções não enzimáticas entre glícidos e grupos aminas livres. No que toca à glicação proteica, esta ocorre com a formação de aductos entre os resíduos de arginina e lisina, e contrasta com a glicosilação enzimática, que representa um dos principais mecanismos de modificações pós-traducionais altamente regulado e específico (Kikuchi et al. 2003). Por sua vez, a glicação não é um processo enzimático nem regulado.

O primeiro passo na glicação proteica envolve o ataque nucleofílico pelo átomo de azoto do grupo amina da proteína ao grupo carbonilo electrofílico de um glícido, como a glucose. Após a eliminação de uma molécula de água, forma-se uma base de Schiff, que sofre um rearranjo espontâneo designado por rearranjo de Amadori, para formar um produto de Amadori (Hodge 1955; Koenig et al. 1977; Thorpe & Baynes 2003). A reacção é reversível até à formação do produto de Amadori. Embora estes produtos sejam mais estáveis que as bases de Schiff, sofrem uma série de reacções complexas, como rearranjos intramoleculares não oxidativos e hidrólise, para formar um aducto de Amadori (Bucala & A. Cerami 1992; Vlassara 1994; Westwood & Thornalley 1997). Estes aductos sofrem oxidação e fragmentação, dando origem a cadeias glicídicas mais pequenas e intermediários reactivos, como é o caso do glioxal e metilglioxal (MGO). Estes dicarbonilos reactivos, descritos como intermediários que se formam durante a segunda fase da reacção de Maillard, reagem com resíduos de lisina e arginina para produzir vários produtos de glicação, na fase final desta reacção (**Figura I-6**). Ao contrário dos produtos resultantes das reacções iniciais da via de Maillard, os AGEs ligam-se irreversivelmente às proteínas, provocando alterações na sua estrutura e função.

A glicação proteica depende da concentração, reactividade e exposição do agente glicante (McPherson et al. 1988; Farah et al. 2005), mas a presença de factores catalíticos (como metais), o pH e temperatura fisiológicos e ainda o tempo de meia vida de uma proteína são condições que também afectam a glicação. Além disso, a localização do resíduo de aminoácido glicável numa proteína com a sua estrutura terciária definida vai influenciar o processo de glicação: os aminoácidos vizinhos afectam o pKa da cadeia lateral alvo e a ligação do agente de glicação pode estar limitada pelas constrições estruturais (Ahmed et al. 2005; Westwood & Thornalley 1997).

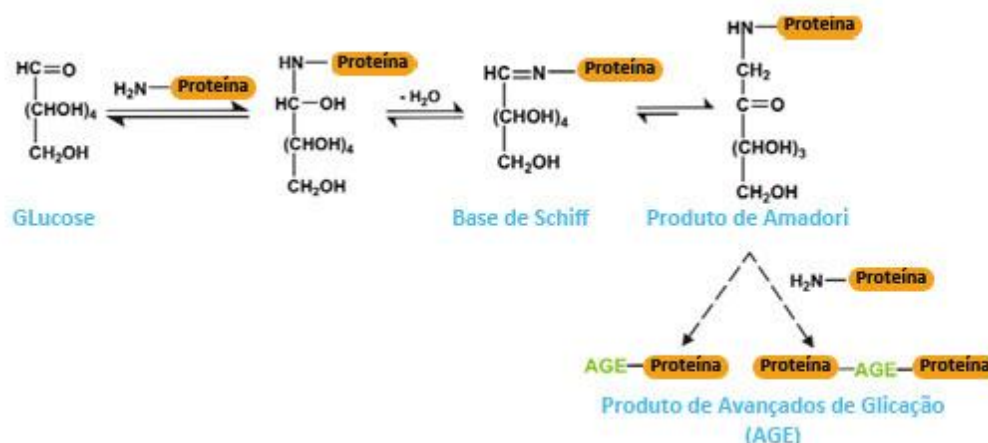


Figura I-6 – Passos iniciais da reacção de Maillard para glicação proteica a partir da glucose. Adaptado de (O'Brien 1997; Westwood & Thornalley 1997).

Na reacção de Maillard, a glucose foi alvo de intenso estudo como agente glicante devido à associação entre os níveis de glicemia na diabetes e a glicação. Porém, o dano induzido pela glucose não está limitado a doentes diabéticos: mesmo em concentrações normais de glucose ocorre glicação e o dano resultante tem um efeito cumulativo com o tempo e idade. A glicação pela glucose leva à formação de 2-oxoaldeídos, através da sua degradação espontânea em condições fisiológicas (Thornalley et al. 1999). Os compostos a que dá origem, são agentes muito mais reactivos que a própria glucose, pelo que a formação dos AGEs derivados destes 2-oxoaldeídos deve apresentar especial relevância na complicação de diabetes e outras doenças (Thornalley 1996; Thornalley et al. 1999). Para além da degradação espontânea da glucose, existem outras fontes dos 2-oxoaldeídos (metilglioxal, glioxal) mais importantes *in vivo* (Hodge 1953).

4.2 Os produtos de glicação

O metilglioxal é (MGO) é o agente de glicação *in vivo* mais importante, formado nas células principalmente a partir dos intermediários fosfatos de triose da via glicolítica, o DHAP (fosfato dihidroxiacetona) e GAP (3-fosfato de D-gliceraldeído) (Richard 1993). Devido às suas características de electrófilo, reage com determinados aminoácidos, nomeadamente com grupos funcionais amina das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos arginina, lisina e cisteína, que têm um carácter nucleofílico. Em concentrações fisiológicas, modifica irreversivelmente proteínas, formando ligações intermoleculares e levando à sua desnaturação (Lo et al. 1994).

Na **Figura I-7** estão representados os principais AGEs proteicos derivados da glicação induzida pelo MGO que são: 1) Hidrohimidazolonas (MG-H), 2) Argpirimidina (AGP), 3) carboxietil lisina (CEL), 4) Tetrahidropirimidina (THP) e 5) MOLD (do inglês, methylglyoxal-derived lysine dimer) (Thornalley 2003).

As MG-H são o principal produto de glicação proteica induzida pelo metilglioxal e existem como três isómeros estruturais (MG-H1, 2 e 3) (Ahmed & Thornalley 2002; Ahmed et al. 2002), seguidas da AGP.

Contrariamente à glucose, o MGO modifica preferencialmente resíduos de arginina (Lo et al. 1994; Oya et al. 1999).

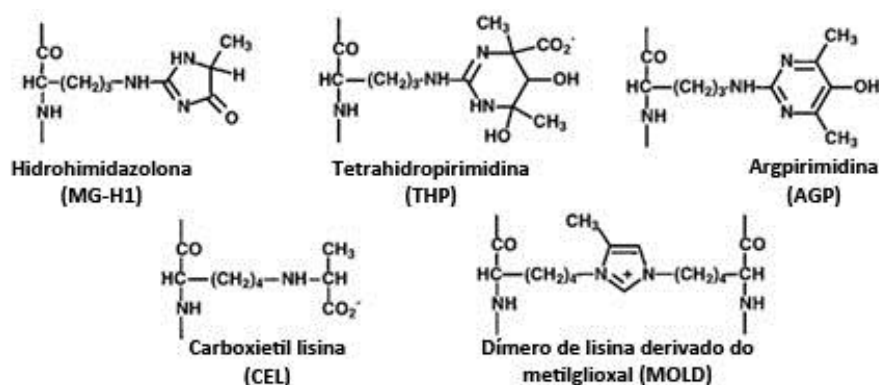


Figura I-7 – AGEs proteicos formados pelo metilglioxal. Adaptado de (Thornalley 2003).

A glicação proteica conduz a alterações na função de determinadas proteínas, com consequências para a fisiologia normal da célula. Além disso, sabe-se que as proteínas glicadas promovem directamente o *stress* oxidativo, através da interacção com receptores celulares que desencadeiam respostas células, como inflamação, que levam à disfunção celular. Os resíduos de arginina, lisina e cisteína participam regularmente nos centros activos dos enzimas

(D. L. Nelson & M. M. Cox 2004), pelo que a modificação irreversível destes resíduos irá alterar a actividade enzimática. Um exemplo é a inactivação do enzima superóxido dismutase com a formação de *cross-links* covalentes que levam a libertação dos iões cobre do enzima (J. H. Kang 2003). Enquanto uns enzimas vêem a sua actividade reduzida – como lactato desidrogenase, glutatióno reductase e catálase – (P. E. Morgan et al. 2002; H. Yan & J. J. Harding 1997), outros apreciam um aumento com a glicação, como a actividade de esterase da hemoglobina (Sen et al. 2007). Também algumas chaperoninas, como a Hsp27, experimentam um aumento da sua actividade quando glicadas (Nagaraj et al. 2003).

A glicação exerce também alterações ao nível da conformação molecular, causando a redistribuição dos elementos de estrutura secundária (Bakhti et al. 2007). Esta reorganização favorece a hidrofobicidade, alterando a estabilidade proteica (Bakhti et al. 2007; Seidler & Seibel 2000), o que pode favorecer o *misfolding* de proteínas no contexto de doenças neurodegenerativas e amilóides (Bouma et al. 2003; Ledesma et al. 1994).

4.3 O sistema dos Glioxalases

Os baixos níveis fisiológicos de metilglioxal são resultado de um sistema eficiente de desintoxicação. Aquele que mais contribui para a sua remoção, é o sistema dos Glioxalases (**Figura I-8**), uma vez que promove a eliminação do grupo químico reactivo, enquanto o intermediário formado é considerado como não tóxico. Este sistema consiste em dois enzimas (Racker 1951). O primeiro enzima deste sistema, o Glioxalase I (EC 4.4.1.5), é um enzima estritamente citosólico, enquanto o Glioxalase II (EC 3.1.2.6) pode ser encontrado no citosol e mitocôndrio. O sistema dos Glioxalases converte o MGO em D-lactato através do intermediário S-D-lactoilglutatio (SDLG). Para que a primeira reacção tenha lugar, é necessário que ocorra a formação de um hemiacetal, produto de uma reacção espontânea entre o MGO e o glutatióno na sua forma reduzida (GSH). O Glioxalase I catalisa a isomerização deste aducto a SDLG (Vander Jagt et al. 2001; Mannervik & Ridderström 1993), o qual é hidrolisado pelo Glioxalase II, formando D-lactato com regeneração do GSH (Vander Jagt 1993; Vander Jagt et al. 2001).

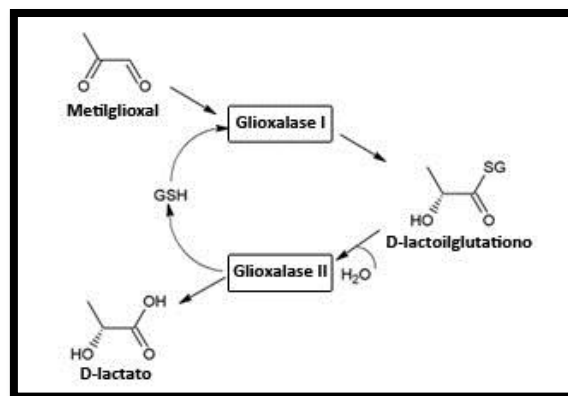


Figura I-8 – Sistema dos Glioxalases. Adaptado de (Krautwald & Gerald Münch 2010).

Para além do MGO, o sistema dos Glioxalases também participa na eliminação de outros oxoaldeídos reactivos, como o glioxal.

O metilglioxal pode ainda ser convertido em hidroxiaçetona e D-lactaldeído pelo enzima Aldose Reductase (EC 1.1.1.21), dependente de NADPH (Vander Jagt & Hunsaker 2003).

O Glioxalase I é um enzima cuja função tem sido associada a um aspecto protector em certas doenças. Nomeadamente na AD verificou-se em cérebros de pacientes com demência um aumento da sua expressão em comparação a cérebros de saudáveis (F. Chen et al. 2004). A relação que os produtos de glicação têm com esta condição, agravando os seus sintomas e favorecendo a sua progressão, reforça uma vez mais a importância que este sistema de desintoxicação dos compostos carbonilos tem para a prevenção da formação de AGEs.

Por outro lado, o aumento de modificações de proteínas por AGEs é uma característica particular do envelhecimento, pelo que os mecanismos de defesa contra estas moléculas ou os seus precursores devem encontrar-se aumentados na população envelhecida. Um estudo de Kuhla *et al.* veio demonstrar exactamente que o reforço da defesa contra estes elementos no cérebro passa pelo aumento progressivo da expressão de Glioxalase I até aos 55 anos, onde atinge a sua expressão máxima e após os quais diminui progressivamente (B Kuhla et al. 2006). Este aumento parece tomar a forma de um mecanismo compensatório contra os níveis elevados de oxoaldeídos e a acumulação de AGEs. Contudo, o declínio na sua expressão bem como da sua actividade a par do envelhecimento pode levar ao aumento das espécies carbonílicas reactivas, seguindo-se glicação de proteínas e deterioração dos tecidos.

Em último lugar, é de realçar que o Sistema dos Glioxalases é particularmente importante na supressão da glicação mediada pelo metilglioxal em patologias em que as concentrações de oxoaldeídos estão aumentadas, como a diabetes e urémia (Thornalley 2003).

4.4 A glicação proteica em doenças amilóides e neurodegenerativas

Os produtos de glicação avançada encontram-se associados a várias doenças de origem não diabética, influenciando a sua patogenicidade e desenvolvimento (Kume et al. 1995). Esta hipótese foi introduzida com base nas características comuns entre os depósitos amilóides e os produtos avançados de glicação. As proteínas modificadas por AGEs são insolúveis, resistentes à proteólise e apresentam uma estrutura em folhas β , à semelhança do material isolado de diversos depósitos amilóides (M. X. Fu et al. 1992; M. X. Fu et al. 1994). Uma vez que se pretende apenas realçar o envolvimento da glicação nalgumas doenças mais proeminentes, neste contexto vão ser descritos algumas observações sobre a sua relação com os AGEs, sem um desenvolvimento detalhado sobre as patologias mencionadas.

As doenças de Parkinson (PD) e Alzheimer são bons exemplos de patologias onde ocorre a acumulação de AGEs em depósitos amilóides (S. Du Yan et al. 1997; Castellani et al. 1996). Dadas as condições normais de glicemia nestas patologias, propôs-se um novo termo para o *stress* celular, designado de *stress* carbonílico, que se deve a um aumento generalizado da concentração de espécies carbonílicas reactivas precursoras de AGEs, como é o caso do MGO. A glicação será então fruto do aumento dos agentes de glicação e/ou diminuição do seu metabolismo, e não consequência de condições hiperglicémicas (Baynes & Thorpe 1999).

Na doença de Alzheimer, existe um aumento do conteúdo em AGE nas placas A β (Vitek et al. 1994), e a glicação da proteína Tau aumenta a fibrilhogénese desta proteína ao estabilizar os filamentos nucleados (Necula & Kuret 2004). A formação de AGEs em proteínas A β promove a nucleação e precipitação desta proteína, sugerindo um mecanismo adicional pelo qual a reacção de Maillard pode acelerar a progressão da AD (K. Chen et al. 2006). Alguns dados sugerem que a formação destes produtos de glicação seja um efeito secundário da própria patologia, no entanto, embora os níveis de AGEs aumentem naturalmente com a idade, doentes com Alzheimer mostram um aumento mais acentuado na formação destes ao longo do tempo mas também precocemente (Lüth et al. 2005).

Em pacientes com Parkinson, a doença neurodegenerativa mais comum a seguir à AD, foi demonstrada a presença de produtos glicados junto aos corpos de Lewi e numa proporção

muito superior a outras áreas do cérebro comuns a indivíduos de idade avançada (Castellani et al. 1996). Uma propriedade importante na PD está relacionada com os níveis diminuídos de GSH, em fases iniciais da doença. Esta escassez de GSH resulta numa actividade diminuída do sistema dos Glioxalases, reflectindo um *stress* carbonílico responsável pelo aumento da concentração de AGEs.

Independentemente da cronologia na formação de AGEs, sabe-se que a sua acumulação está relacionada com respostas inflamatórias sustentadas e com o *stress* oxidativo, ambos recorrentes em doenças neurodegenerativas. A glicação pode contribuir de forma dinâmica para estas doenças multifactoriais, promovendo, acelerando ou estabilizando a agregação de proteínas de carácter patológico e através da indução de respostas que levam ao dano e morte celular.

4.5 Glicação e PAF

Na PAF foi detectada imunorreactividade em fibras amilóides com anticorpos para AGEs, sugerindo que estes estão envolvidos nesta doença amilóide (Nyhlin et al. 2000). A presença destes produtos foi mais tarde confirmada por Gomes *et al.*, através da identificação de Argpirimidina nos depósitos amilóides de doentes PAF (Gomes et al. 2005). A toxicidade dos depósitos amilóides poderá estar também relacionada com os AGEs, uma vez que proteínas modificadas com estes produtos são tóxicas para as células. A observação de marcadores de *stress* oxidativo associados aos depósitos amilóides sugere que ocorra a produção de espécies reactivas de oxigénio e/ou interacção com receptores específicos que desencadeiam *stress* oxidativo local (M. M. Sousa, S. Du Yan, et al. 2001). Foi descrito para esta doença que o receptor para AGEs, o RAGE, actua também como receptor para a TTR na forma fibrilar, com um aumento da sua expressão em tecidos com estes depósitos (M. M. Sousa, S. Du Yan, et al. 2000).

O envolvimento de AGEs na formação dos depósitos pode ainda explicar a transição de agregados solúveis a fibras insolúveis e altamente resistentes à proteólise *in vivo*, bem como uma proteína não mutada se dissocia e agrega formando fibras amilóides, como no caso da TTR no contexto da SSA. Dadas as características das proteínas modificadas por AGEs, insolubilidade, resistência à proteólise e elevado número de ligações cruzadas, parece existir uma relação entre a amiloidogénese e a formação de AGEs. A glicação com consequente formação de AGEs nos agregados solúveis de TTR pode levar ao carácter insolúvel e aumento

da resistência à proteólise nestes agregados, permitindo que evoluam formando fibras amilóides.

Mesmo que a reacção de Maillard não seja a causa primária destas patologias, parece surgir uma certeza de que o envolvimento da glicação de proteínas amiloidogénicas, com a formação de AGEs e ligações cruzadas, deverá estabilizar os depósitos amilóides e torná-los mais resistentes à degradação. Para além disso, os AGEs iniciam diversas respostas celulares comuns à maioria das doenças de carácter amilóide e neurodegenerativo, como respostas inflamatórias e *stress* oxidativo.

No entanto, no que toca à PAF são muitas as dúvidas que permanecem sobre os processos que originam a deposição da TTR e sobre a toxicidade dos seus agregados/depósitos. À semelhança das doenças de Alzheimer e Parkinson, é provável que a formação de AGEs seja importante na PAF, mas falta esclarecer a sua função na patogénese e os mecanismos subjacentes à influência que exerce nesta doença. A glicação poderá ser um fenómeno que explique as incómodas diferenças fenotípicas na Paramiloidose e que talvez venha a completar o seu modelo de patogénese molecular. É por isso necessário aprofundar o conhecimento sobre o envolvimento desta modificação pós-traducional na PAF.

5 – O transplante hepático em PAF

5.1 O transplante hepático de cadáver (CLT)

O uso da transplantação hepática como modalidade terapêutica, uma prática iniciada por Starzl em 1963, para a PAF iniciou-se na década de 90 na Suécia. Seria lógico pensar que esta abordagem iria impedir a progressão da doença e talvez levar à regressão das lesões constituídas, uma vez que o fígado produz cerca de 90% da TTR total. Porém, mesmo abolindo a síntese da variante TTR amiloidogénica na sua grande maioria, apenas se observou uma interrupção ou atraso na progressão da patologia, sem diminuição das queixas clínicas (Holmgren et al. 1991). Este facto poderá ser consequência de um tratamento tardio, onde os primeiros sintomas representam uma extensão agravada da doença nestes pacientes.

Embora não represente em si uma cura, actualmente o transplante hepático é o único método eficaz contra o desenvolvimento da PAF (Adams et al. 2000), que oferece uma extensão da longevidade caso seja efectuado atempadamente. A qualidade de vida que se oferece ao paciente é satisfatória face ao prognóstico sem tratamento, embora pese a

necessidade de uma terapêutica imunossupressora permanente (Jonsén et al. 2001; Perdigoto et al. 2003). A principal questão que se mantém em relação a esta prática é se a sobrevivência dos indivíduos sujeitos a transplante é maior àqueles que não sofrem esta intervenção cirúrgica (O B Suhr et al. 2005; Stangou & Hawkins 2004), mas dados estatísticos mostram que a sobrevivência aos 5 anos é de 90%, aumentando em 20% em indivíduos com a variante V30M (A. J. Furtado 2003).

5.2 O transplante hepático sequencial (dominó) (DLT) e aquisição de doença amilóide

O transplante hepático em dominó (**Figura I-9**) foi introduzido pelo Professor Alexandre Furtado, Director do Hospital Universitário de Coimbra, com o objectivo de diminuir a escassez de fígados para transplante, utilizando os fígados PAF (em tudo funcionais, excepto na produção de uma proteína mutante amiloidogénica) em pacientes com tumores ou doenças hepáticas graves com pouca esperança quer de vida, quer de receber um transplante. Explorou-se assim a hipótese de que uma doença autossómica dominante como a PAF pudesse interromper a sua progressão quando transposta para um doente não PAF, ou que pelo menos reproduzisse nestes pacientes o seu curso de expressão temporal de forma idêntica, o que equivaleria a cerca de duas décadas, em muitos casos superior à própria esperança de vida normal do paciente com a devolução de alguma qualidade de vida.

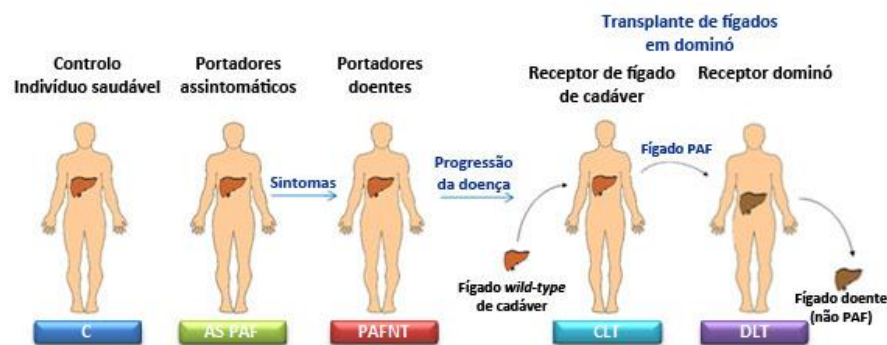


Figura I-9 – Esquema de transplante em dominó. C – indivíduos saudáveis, grupo controlo. AS PAF – portadores assintomáticos. PAFNT – portadores com manifestações clínicas da doença não transplantados. CLT – doentes PAF sujeitos a um transplante fígado *wild-type* de cadáver. DLT - Receptores de um fígado PAF em dominó (doentes que sofrem de uma patologia hepática grave não relacionada com a Paramiloidose).

A TTR V30M é detectada no sangue dos receptores desde os primeiros meses após o transplante, pelo que as consequências sobre os tecidos e órgãos tornaram-se desde logo objecto de atenção. A utilização de métodos de detecção precoce e mais sensíveis ainda na fase pré-clínica foram essenciais para uma avaliação da evolução da PAF em receptores. Estes testes consistiram na detecção de auto-anticorpos contra a TTR mutante no plasma destes

indivíduos (Y. Ando et al. 2002) e na presença de marcadores de *stress* oxidativo induzidos pela presença da TTR nos tecidos, como a caspase-3. Os resultados das primeiras investigações apontaram para que 3 anos após o transplante já seria possível detectar depósitos amilóides na pele dos receptores (M. M. Sousa et al. 2004). Foram também encontrados depósitos amilóides em nervos, mas sem alterações clínicas ou electromiográficas da doença. Estes depósitos encontrados eram escassos e não apresentavam sinais de *stress* oxidativo. Contudo, com estes dados concluiu-se que a formação da substância amilóide é mais rápida do que previsto, e que no receptor a progressão da PAF é mais acelerada que nos portadores originais da Paramiloidose, remetendo uma vez mais para pré-existência de condições que favorecem o desenvolvimento desta patologia.

5.3 Outros tratamentos

O transplante de fígado é actualmente a única terapia eficaz em doentes PAF, mas é urgente encontrar terapias mais simples e menos invasivas. As alternativas que idealmente permitam a eliminação permanente e sistémica dos sintomas prendem-se com 1) a estabilização da estrutura tetramérica da proteína, 2) redução da TTR mutada em circulação, 3) com a inibição da formação de fibras ou 4) promoção da sua desagregação/dissolução.

Os agentes inibidores poderão actuar através da estabilização do tetrâmero da TTR de forma a impedir a sua dissociação em espécies monoméricas com potencial amiloidogénico. Para isso é preciso estabilizar o tetrâmero com a ligação de pequenas moléculas. Miroy e colaboradores demonstraram que a tiroxina estabiliza o tetrâmero de TTR e impede a sua dissociação e subsequentes alterações conformacionais, impedindo assim a formação de fibras amilóides *in vitro* (miroy 1996). Outros compostos para além da tiroxina foram identificados como estabilizadores da TTR. Temos como exemplo o 2,4,6-triodofenol (miroy 1996) e o ácido flufenamico (Peterson 1998). No entanto, a dificuldade do uso de ligandos para estabilizar o tetrâmero de TTR é a presença no plasma de outras proteínas capazes de se ligar a esses compostos.

Relativamente à desagregação de fibras, existem já identificados moléculas que destroem as fibras amilóides de TTR dando origem a um material amorfo (palha 2000). Fala-se por exemplo do 4-desoxi-4-iodoxorubicina (IDOX), que apresenta como grande desvantagem a sua cardiotoxicidade. Os fármacos que rompem estas fibras podem também ser úteis em amiloidoses derivadas de outras proteínas, como é o caso da proteína β A na doença de Alzheimer (saraiva 2001).

II – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo apresenta-se uma introdução aos aspectos básicos das metodologias utilizadas no desenvolvimento do trabalho prático, os protocolos experimentais otimizados e a proveniência dos materiais utilizados/consumidos.

1 - Obtenção das amostras de plasma humano

1.1 Colheita

Fizeram-se colheitas de sangue em indivíduos não portadores de mutações conhecidas da TTR (controlos), portadores da mutação V30M assintomáticos (AS PAF), em indivíduos não transplantados com manifestações clínicas da doença (PAFNT) e em pacientes sujeitos a um transplante de fígado *wild-type* de cadáver (CLT) – por possuírem sintomas da PAF - e de fígado PAF (DLT) – por sofrerem de uma patologia hepática não relacionada com a PAF.

Tabela II-1 – Descrição das amostras de plasma humano utilizadas durante o trabalho experimental. NA - não aplicável. * Após o transplante.

Nome amostra	Portador TTR V30M	TTR V30M circulação	Idade	Género	Tempo recolha após transplante (meses)
C6	N	N	23	F	NA
C8	N	N	23	F	
C9	N	N	25	M	
AS PAF 18	S	S	36	M	
AS PAF 19	S	S	18	F	
AS PAF 20	S	S	28	M	
PAFNT 8	S	S	26	M	
PAFNT 10	S	S	37	F	
PAFNT 16	S	S	25	M	
DLT 12	N	S*	58	M	2
DLT 7	N	S*	61	M	10
DLT 11	N	S*	54	M	26
DLT 10	N	S*	55	M	48
CLT 2	S	N	26	F	2
CLT 11	S	N	29	M	10
CLT 12	S	N	24	M	26
CLT 7	S	N	30	M	48

Para controlos, assintomáticos e doentes PAFNT colheram-se amostras de 3 sujeitos representativos de cada grupo, com uma faixa etária compreendida entre os 18 e os 37 anos. Em transplantados, usaram-se 4 amostras por grupo (CLT e DLT) provenientes de indivíduos com idades compreendidas entre os 24 e 61 anos. Nos indivíduos transplantados, as colheitas foram feitas 2, 10, 26 e 48 meses após a intervenção cirúrgica. Todos os sujeitos são

portadores heterozigóticos para a mutação V30M, há excepção de controlos e pacientes DLT que não possuem nenhuma mutação conhecida para a TTR (**Tabela II-1**).

As amostras biológicas foram centrifugadas a 1,800 g durante 5 minutos a 4°C, e o plasma (sobrenadante) foi armazenado em alíquotas de 200µL a -80°C. Todos os sujeitos deram o seu consentimento por escrito, e o protocolo foi aprovado de acordo com as regras éticas de EEC (*Executive Ethics Commission*).

1.2 Quantificação proteica pelo método de Bradford

A quantidade de proteína nas amostras de plasma humano foi quantificada usando o método de Bradford (Bradford 1976) em microplaca. Este método baseia-se na interacção entre o azul de Coomassie G-250 (reagente Bradford, Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) e as cadeias laterais de aminoácidos básicos (especialmente arginina, lisina e histidina) ou aromáticos (Compton & C. G. Jones 1985). Após esta ligação, o corante adquire um estado estável, com um comprimento de onda de absorção máximo de 595nm (Reisner et al. 1975; Sedmak & Grossberg 1977). O número de moléculas deste corante que se liga a uma proteína é aproximadamente proporcional ao número de cargas positivas presentes nessa mesma proteína.

Para traçar a curva de calibração, usou-se a Albumina sérica de bovino (BSA do inglês, *bovine serum albumin*, Sigma) como proteína padrão numa gama de concentrações adequadas à sensibilidade do ensaio (125 - 1,000 µg/mL para a BSA). O método adaptado à quantificação em microplaca consiste em aplicar 10µL, quer dos padrões, das amostras já diluídas ou do branco, em triplicados (mínimo) mais 200µL do reagente Bradford (Bio-Rad) 5x diluído. É necessário deixar a incubar à RT (do inglês, *room temperature*) durante pelo menos 5 minutos. A medição da absorvência a 595nm é feita - após uma agitação vigorosa - no leitor microplacas Sunrise (Tecan).

2 - Electroforese desnaturante unidimensional: SDS-PAGE

2.1 Fundamentos teóricos

A electroforese refere-se ao movimento de partículas carregadas quando um campo eléctrico é aplicado. Como muitas moléculas biológicas apresentam carga eléctrica cujo valor e sinal depende das suas características mas também do pH e da composição do meio em que se

encontram, este conceito foi utilizado para desenvolver um método de separação para várias entidades biológicas, como proteínas. Embora existam vários suportes para a separação de proteínas, a electroforese em gel tornou-se o método mais amplamente usado (**Figura II-10**), e a separação em SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), também conhecida como método de Laemmli, é a técnica analítica mais comumente praticada quando se trata de proteínas (Laemmli 1970).

Os géis actuam como crivos moleculares, que durante a electroforese forçam o movimento das proteínas por entre os poros da matriz. A % total da concentração (peso/volume) de monómero (acrilamida e bisacrilamida), designado por T, é o parâmetro que define o diâmetro do poro, sendo inversamente proporcional a este. Com base nesta concentração é possível alterar o tamanho do poro de forma reproduzível. Existe ainda um outro parâmetro, a % de monómero total (representado pelo crosslinker, a bisacrilamida) que influencia o efeito do crivo molecular de um gel. Porém, este não tem uma relação linear com o aumento da sua concentração, por isso foi estabelecido que para géis SDS-PAGE se deve utilizar uma % C de 2,6% (37,5:1 acrilamida:bisacrilamida).

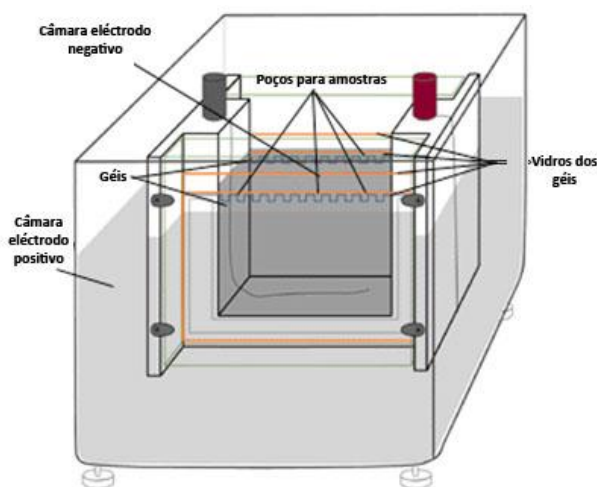


Figura II-10 – Representação dos instrumentos de separação electroforética vertical no formato de mini-gel. A câmara do eléctrodo superior (negativo) é formada por duas cassetes de géis fixas ao suporte central. A montagem dos géis fica submersa por tampão na câmara do eléctrodo inferior (positivo). São os géis que fazem o contacto entre ambas as câmaras. Adaptado de (2).

A função do SDS cai sobre a dissociação das proteínas nos seus constituintes polipeptídicos, para que possam ser separados na base do seu peso molecular. Este detergente destrói as interacções hidrófobas que sustentam a estrutura tridimensional nas proteínas, levando-as a perder a sua forma globular. Além de solubilizar proteínas, o SDS confere ainda uma relação de carga/massa uniforme e, juntamente com a aplicação de β -mercaptoetanol (que reduz as ligações persulfureto intra ou intermoleculares), é garantida a

adopção de uma forma monomérica alongada pelas proteínas. Assim, a migração não será afectada pela carga individual da proteína e será direccionada para o ânodo em função do seu tamanho/peso molecular, e as taxas de migração dos complexos polipéptidos-SDS serão inversamente proporcionais aos logaritmos das suas massas moleculares (MM): quanto maior um polipéptido mais lenta a sua migração (Weber & Osborn 1969). Uma vez que pode ser usado para estimar MM, a SDS-PAGE tornou-se o método electroforético de separação em gel mais popular (M. J. Dunn & Bradd 1993; Garfin 1990; Bischoff et al. 1998).

Os sistemas de separação SDS-PAGE ou Laemmli, usam um sistema de tampões multifásicos ou descontínuos, isto é, a composição dos tampões constituintes dos géis de concentração e separação é diferente, bem como a do tampão de corrida (**Figura II-11**).

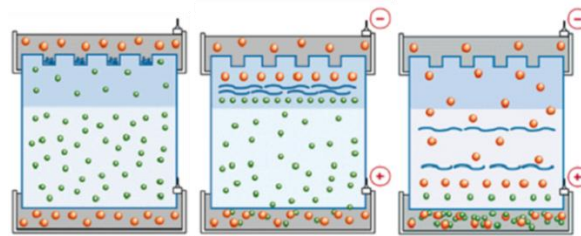


Figura II-11 – Esquema de separação de proteínas num sistema SDS-PAGE descontínuo. A) Antes de aplicação de um campo eléctrico. **B)** Quando aplicada uma diferença de potencial os iões do tampão e as proteínas começam a migrar no gel de concentração. **C)** No gel de separação as proteínas. A verde: iões cloro nos géis de concentração e separação. A laranja: iões glicina nas câmaras. Adaptado de (3).

Brevemente, no gel de concentração, os iões de cloro e glicina têm mobilidades diferentes na presença de um campo eléctrico, estando os primeiros à frente das proteínas a separar e os segundos atrás. As proteínas da amostra vão compactar-se entre as frentes destes iões numa ordem de mobilidade decrescente (**Figura II-11 B**). Quando o gel de separação é atingido, devido ao pH mais elevado a glicina é mais ionizável, o que aumenta a mobilidade dos seus iões (**Figura II-11 C**) e inicia a separação no gel. A separação electroforética continua depois em condições de pH constante.

2.2 Os géis

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE num sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) ou Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Os mini-géis (8,3 x 7,3 cm) de concentração e separação foram feitos com uma percentagem de acrilamida de 4 e 12, respectivamente (**Tabela II-2**).

Tabela II-2 – Composição dos géis de concentração e separação à % de acrilamida indicada. A ordem pela qual os reagentes estão indicados corresponde à sua ordem de adição. Volumes indicados para 1 gel.

Reagentes []i	Gel Concentração (4%)	Gel Separação (12%)
Água	1,59 mL	2,175 mL
0,5M Tris-HCl pH 6,8	630 uL	-
1,5M Tris-HCl pH 8,8	-	1,25 mL
Acrilamida/Bis 40%	250 uL	1,5 mL
SDS 10%	25 uL	50 uL
APS 10%	12,5 uL	25 uL
TEMED	5uL	5uL

Para a realização da electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi utilizada Acrilamida/Bis, persulfureto de amónio (APS), Tris e Glicina da Bio-Rad. O N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) e o dodecilsulfato de sódio (SDS) foram obtidos pela Sigma.

2.3 Tratamento e aplicação das amostras

2.3.1 Amostras de plasma

As amostras de plasma foram diluídas 10 vezes em água do tipo I (ultrafiltrada e esterilizada produzida em equipamento MilliPore). A 20µg de proteína total (aproximadamente 3µL de plasma diluído) adicionaram-se 5µL de **Tampão de Aplicação** (62.5mM Tris-HCl pH6.8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0.01% azul bromofenol). As amostras foram fervidas durante 2mins a 100°C num Analog Dry Block Heater (VWR) e depois aplicadas no gel. O glicerol e o Azul de bromofenol foram adquiridos à Merck, e o β – mercaptoetanol à Sigma.

2.4 Corrida electroforética

Após aplicadas as amostras e os marcadores de massa molecular de 250 a 10kDa (5µL, Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad), a electroforese foi efectuada em **Tampão de Corrida Desnaturante** (25mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS; pH ≈ 9), com uma fonte de alimentação PowerPac Basic Power Supply™ (Bio-Rad). A separação foi realizada a uma diferença de potencial inicial de 60V, a qual se aumentou para 80V a meio da corrida. A separação foi concluída quando o azul de bromofenol atingiu o fim do gel de resolução.

2.5 Coloração dos géis

As bandas contendo proteína foram visualizadas após coloração com o **Azul Coomassie** (50% água, 40% metanol, 10% ácido acético glacial, 2% (m/v) Coomassie G-250) O/N (do inglês, *overnight*) com agitação constante seguida de descoloração em **Solução Descorante** (40% água, 50% metanol, 10% ácido acético glacial). O metanol é da Merck, o ácido acético glacial da Fisher Scientific, a água utilizada foi do tipo II e o Coomassie G-250 adquirido à Bio-Rad.

Os géis foram digitalizados com uma resolução de 600 dpi, no ImageScanner (Amersham Biosciences.)

3 - Western blotting

3.1 Fundamentos teóricos

As proteínas podem também ser detectadas com base nos princípios imunológicos, após a sua separação electroforética. Esta técnica é conhecida como Western blotting ou Immunoblot, e baseia-se na elevada especificidade de interacção e ligação entre anticorpos (Ab) e antígenos, o que torna a detecção imunológica muito mais sensível que os métodos convencionais de detecção com corantes químicos. Assim, uma mistura complexa que possua apenas vestígios da proteína de interesse pode ser analisada com rigor com este método de detecção. Nestes ensaios é necessário recorrer à ligação do anticorpo a moléculas de fácil detecção, como enzimas ou *dyes* fluorescentes. Os enzimas são particularmente apropriados para servir este papel, e os mais comumente utilizados são o HRP (do inglês, *horseradish peroxidase*) e o AP (do inglês, *alkaline phosphatase*) possuindo tanto substratos cromogénicos como luminescentes.

A detecção imunológica não pode ser realizada directamente nos géis, pois os Ab são moléculas de grande dimensão que penetram muito lentamente na matriz de poliacrilamida. Para proceder a uma detecção eficiente as proteínas devem ser imobilizadas na superfície de uma membrana reproduzindo o padrão de separação electroforética, o que se designa de “blotting”. Num Western blotting, após a corrida electroforética, um gel é empacotado num suporte indicado com uma membrana (**Figura II-12**) e a aplicação de uma voltagem perpendicular ao plano do gel força as proteínas a migrarem da matriz de poliacrilamida para a superfície da membrana. Dada a carga global negativa das proteínas, estas migram em direcção ao ânodo, ficando a sua migração impedida quando se ligam à membrana.

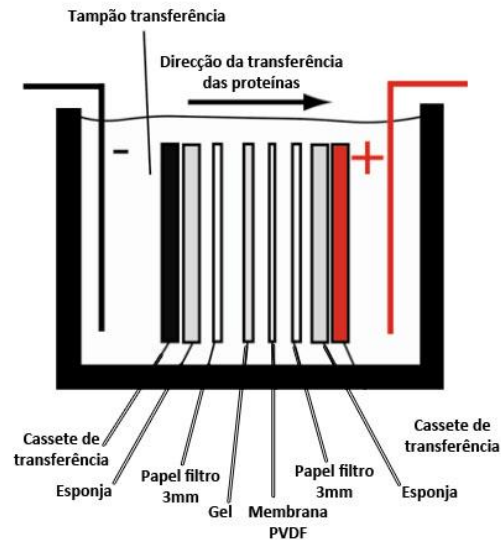


Figura II-12 - Equipamento de wet-Western blotting. Adaptado de (4).

A maioria dos westerns é marcada em 2 passos, usando anticorpos primários e secundários. Os primeiros detectam directamente a proteína de interesse. Por outro lado, os anticorpos secundários, aos quais se encontram acoplados o marcador (normalmente enzimático) estão direccionados para detectar os anticorpos primários. Normalmente são policlonais, pelo que vários anticorpos secundários vão-se ligar a cada anticorpo primário. Estes dois passos resultam numa amplificação do sinal final.

3.2 Transferência

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (como descrito anteriormente) e em seguida procedeu-se à sua transferência para uma membrana de PVDF (Immobilon-P IPVH00010, Millipore) previamente activada em metanol e equilibrada em tampão de transferência, usando o sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad), semelhante ao da **Figura II-12**. Brevemente, dispõe-se a membrana junto ao gel e os dois são empacotados entre materiais absorventes, como esponjas e papel 3MM (esponja, papel, gel, membrana, papel, esponja). Esta “sandwich” é acondicionada por um suporte sólido para assegurar um contacto firme entre o gel e a membrana e submersa em **Tampão de Transferência** (39mM glicina, 48mM Tris, 0.0375% SDS (m/v), 20% metanol (v/v)). A transferência procede durante 65 mins a 100V.

É necessário usar uma cuvette de gelo na tina de electroforese para assegurar a refrigeração do tampão e compensar a produção de calor durante o processo, o qual é prejudicial à eficiência da transferência. Para verificar se a transferência foi bem-sucedida, as

membranas foram coradas com uma solução **Ponceau S** (0.1% (m/v), 1% (v/v) ácido acético glacial). O Ponceau S foi adquirido à Sigma.

3.3 Bloqueio e incubação com anticorpos 1º e 2º

Bloquear a membrana impede interações não específicas entre os anticorpos primários e/ou secundários e a membrana. As membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1h com agitação constante numa **Solução de Bloqueio** composta por 5% (m/v) leite em pó dissolvido em **TBS-T** (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.1% (v/v) Tween 20). Adquiriu-se à Merck o NaCl e à Sigma o Tween 20.

Incubaram-se as membranas em anticorpo primário O/N a 4°C com agitação constante, numa **Solução de Incubação** com 1% (m/v) de leite em pó em TBS-T. As diluições dos vários anticorpos utilizados encontram-se na **Tabela II-3**.

Tabela II-3 – Anticorpos primários e secundários utilizados nas detecções por Western blotting e diluições optimizadas utilizadas. P = policlonal. M = monoclonal.

Anticorpo	Tipo	Diluições	Marca	Anticorpo Secundário
Transtirretina	P	1/4000	Santa Cruz Biotechnology	Coelho
Argpirimidina	M	1/1000	JaICA	Ratinho
Tetrahidropirimidina	M	1/2000	Santa Cruz	Ratinho
sRAGE	M	1/500	Santa Cruz Biotechnology	Ratinho
Fibrinogénio	P	1/20000	Calbiochem	Coelho
Glioxalase I	P	1/2000	Santa Cruz	Coelho
Aldose Reductase	P	1/2000	Sigma	Rato
Ratinho	P	1/4000	Calbiochem	-
Coelho	P	1/4000	Sigma	-
Rato	P	1/3000	Sigma	-

Para remover excesso de anticorpo não ligado, lavaram-se as membranas 3x durante 15 minutos e com agitação em TBS-T. Após as lavagens, fez-se a incubação com o anticorpo secundário (ver **Tabela II-3**) à temperatura ambiente, durante 3h com agitação constante. No fim desta incubação, as lavagens foram de 4x durante 10 minutos, também em TBS-T.

3.4 Revelação

Num Western blot quimioluminescente, o sinal detectado é um produto transiente de uma reacção presente apenas enquanto a reacção entre enzima e substrato ocorre, onde o substrato é o reagente limitante. Até à exaustão deste, a produção de sinal diminui de forma progressiva até cessar.

Uma vez que os todos os anticorpos secundários utilizados encontram-se conjugados com o enzima HRP, o luminol foi o substrato quimioluminescente utilizado para a detecção. Esta reacção baseia-se na oxidação do luminol pelo H_2O_2 e catalisada pelo HRP com formação de um produto no seu estado excitado (3-aminoftalato). Este produto ao decair para estados de energia mais baixos, liberta fotões com emissão de luz (**Figura II-13**).

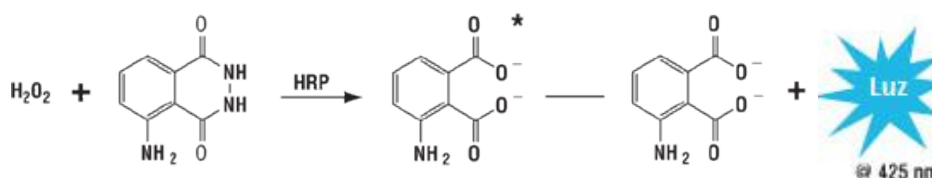


Figura II-13 – Reacção entre o H_2O_2 e o luminol, catalisada pelo HRP com a formação de 3-aminoftalato que emite luz ao decair para estados de energia mais baixos. Adaptado de (5).

Ao longo do trabalho desenvolvido foram utilizados dois *kits* de quimioluminescência baseados na reacção acima descrita: ECL Western blotting Substrate (Pierce) e BM Chemiluminescence Western blotting Kit Mouse/Rabbit (Roche).

A fase de revelação foi realizada numa câmara escura própria. Após incubação das membranas na solução de quimioluminescência seguindo as instruções dos fabricantes, as membranas foram dispostas numa cassette de revelação (Hypercassette, Amersham Life Sciences) entre duas folhas de parafilme. A exposição dos filmes de revelação raios-X (BioMax Film, Kodak) à membrana variou conforme a intensidade luminosa do sinal. Os filmes foram revelados em solução de revelação (GBX, Kodak) e passados numa solução de fixação (GBX, Kodak).

3.5 Análise por Phoretix 1D

A contribuição do sinal de TTR na sua forma monomérica e dimérica foi avaliada com recurso ao *software* Phoretix 1D (TotalLab) a partir de uma chapa de revelação. Com o programa mediu-se a intensidade do sinal ao longo de cada *lane*, permitindo aferir a proporção das duas espécies de TTR nos géis SDS-PAGE.

4 - Electroforese bidimensional

4.1 Fundamentos teóricos

A electroforese bidimensional (2D) foi pela primeira vez introduzida em 1975 por O'Farrel e Klose (Klose 1975; O'Farrell 1975). É uma ferramenta eficaz e amplamente utilizada para a análise de misturas proteicas complexas extraídas de tecidos, células ou outras amostras biológicas. Esta técnica separa as proteínas de acordo com duas propriedades físicas independentes em 2 passos independentes: 1) o passo da primeira dimensão, a focagem isoelectrica (IEF, do inglês *Isoelectric Focusing*), onde as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelectrico (pI); e 2) a segunda dimensão, uma electroforese SDS-PAGE que separa proteínas de acordo com o seu peso molecular, idêntica à técnica descrita anteriormente. Cada *spot* no gel de SDS-PAGE corresponde a uma única espécie proteica da amostra. Assim é possível separar centenas de proteínas numa amostra, obtendo-se informação sobre o seu pI e peso molecular aparente.

A separação por IEF baseia-se no facto de as proteínas serem moléculas anfotéricas, isto é, carregam uma carga global positiva, negativa ou neutra que depende do pH circundante (**Figura II-14**). O pI é definido como o pH ao qual a carga global de uma proteína é zero. As proteínas encontram-se positivamente carregadas a valores de pH inferiores ao seu pI e vice-versa (**Figura II-14**).

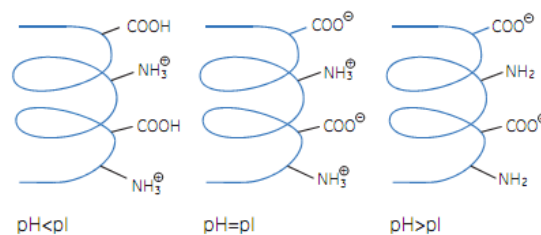


Figura II-14 – Estado de carga global de uma proteína a diferentes condições de pH em relação ao seu pI.
Adaptado de (Healthcare 2004).

A presença de um gradiente de pH é crítica para esta separação. O gradiente forma-se pela incorporação covalente de *immobilines* (um gradiente de grupos ácidos e básicos com capacidade tampão) num gel de poliacrilamida. Nestas condições, e sob a influência de um campo eléctrico, uma proteína migra para a posição no gradiente onde a sua carga global é zero. O gradiente está colocado para que moléculas carregadas negativamente migrem para pH mais baixos (em direcção ao ânodo), até alcançarem um estado global neutro. Porém, se uma proteína se encontra numa região onde o pH é inferior ao seu pI, a sua carga positiva obriga a uma migração em direcção a regiões de pH mais elevados. Estes movimentos das

partículas carregadas dão origem ao efeito de focagem da IEF, que concentra proteínas nos seus pls e permite a sua separação com base em diferenças de carga muito pequenas. Assim, a IEF é um sistema electroforético em equilíbrio, que corre até os movimentos das proteínas deixarem de existir.

Condições desnaturantes permitem a obtenção de uma maior resolução por IEF, pois é assegurada que cada proteína se encontra presente apenas numa única configuração, e há minimização da agregação e de interações intermolecular.

4.2 Preparação, aplicação da amostra e focagem isoelectrica

De cada uma das amostras de plasma diluídas 10x, retirou-se cerca de 350 µg de proteína total, à qual se adicionou 1mL de acetona. Após precipitação O/N a -20°C, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 10.000rpm a 4°C (centrífuga Eppendorf 5804 R com rotores F 34-6-38 e F 45-30-11), e desprezou-se o sobrenadante. Às proteínas precipitadas adicionou-se **Solução de Rehidração** (8M Ureia, 2% (m/v) CHAPS, 0,0002% (v/v) Azul Bromofenol, 1% (v/v) IPG buffer, 1% (m/v) DTT), e incubou-se com agitação até o precipitado se encontrar solubilizado (aproximadamente 1 a 2 horas). Centrifugou-se novamente a 10.000rpm durante 5 minutos (à temperatura ambiente) e o sobrenadante foi aplicado nos sarcófagos (**Figura II-15**).

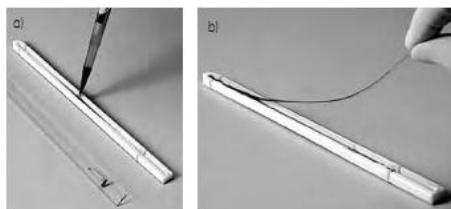


Figura II-15 – Aplicação da amostra no sarcófago (a) e posicionamento da strip (b). Adaptado de (Healthcare 2004).

Foram utilizadas *strips* de gel de poliacrilamida (Immobiline™ DryStrip gel, GE Healthcare), com um gradiente de pH não linear (NL) entre 3 e 11. Nos valores de pH na zona neutra o intervalo entre cada valor de pH é maior do que nos restantes de forma a separar com mais eficiência as proteínas com pl compreendido nessa região. Estas tiras foram colocadas sobre a solução RH contendo a amostra. Também foi adicionado PlusOne Dry Strip Cover Fluid (GE Healthcare) para impedir a desidratação da strip, a cristalização da ureia e otimizar a passagem de corrente durante a focagem.

Com os sarcófagos posicionados equidistantemente no aparelho de focagem isoelétrica Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences), a primeira dimensão de separação deu-se nas seguintes condições:

- 1) 12h, 30V;
- 2) 4h, 500V;
- 3) Grad 1h, até 1000V;
- 4) Grad 2h30min, até 8000V;
- 5) 8000V, até 4400 V/h.

Uma vez terminada a 1ª dimensão (aproximadamente 20h de focagem), recolhem-se as *strips* para tubos de vidros, nos quais são guardadas a -20°C até se proceder à separação por SDS-PAGE.

A Ureia e o CHAPS foram adquiridos à Merck, o IPG Buffer pH 3-11 NL à GE Healthcare, o DTT e a Iodoacetamida à Sigma.

4.3 SDS-PAGE: separação segunda dimensão

As *strips* foram incubadas nas **Solução de Equilíbrio SDS** (6M Ureia, 75mM Tris-HCl pH 8.8, 30% (v/v) glicerol, 2% (v/v) SDS, 0,002% (v/v) Azul bromofenol) I (com 1% (m/v) DTT) e II (com 2,5% (m/v) Iodoacetamida), durante 15 minutos em cada, com agitação constante. Ambas as soluções contêm SDS em excesso, o que garante a aquisição de carga global negativa pelas proteínas, essencial para a 2ª dimensão.

Após a redução com DTT e alquilação com a Iodoacetamida, aplicaram-se as *strips* nos géis SDS-PAGE com uma concentração de 12%, seguindo-se a **Solução de Agarose** (0,5% (m/v) agarose e 0,002% (v/v) azul bromofenol em Tampão de Corrida). A segunda dimensão é feita no sistema vertical Hoefer SE 600 (Hoefer), utilizando a fonte EPS 3500 Electrophoresis Power Supply (Pharmacia Amersham) com uma corrente por gel definida em 25mA e a voltagem como factor não limitante. O tampão utilizado é o mesmo que descrito para o SDS-PAGE em mini-géis (secção II - 2.4). De forma a evitar o aumento da temperatura e evaporação do tampão durante a corrida electroforética, foi utilizado um sistema de refrigeração a 10°C.

A corrida deve prosseguir até o azul da linha da frente sair do gel na totalidade. Os géis são então corados O/N com Coomassie G-250, como descrito previamente.

A agarose foi adquirida à Cambrex.

4.4 Análise dos géis (Progenesis SameSpots)

Utilizando um *software* de análise de imagens de géis 2D, Progenesis SameSpots® (Nonlinear Dynamics), compararam-se os géis dos vários grupos de estudo: controlo, assintomáticos e doentes PAF não transplantados.

Neste programa é realizado um alinhamento dos *spots* dos géis, para garantir que o match/ajuste entre todos os géis da experiência seja máximo. A análise estatística do volume dos *spots* permite identificar proteínas que possam estar diferencialmente expressas no plasma dos indivíduos testados. Os *spots* de interesse são ordenados de acordo com o valor de *p-value* resultante da análise ANOVA. Outro parâmetro que este *software* disponibiliza é a diferença de expressão baseada no volume do *spot* normalizado. Através de uma análise dos PCA (do inglês, *Principal components analysis*), é possível separar e agrupar os géis de acordo com a variação global da sua expressão proteica. Esta análise foi realizada em colaboração com o Dr. Ricardo Gomes do ITQB (Instituto de Tecnologia Química e Biológica).

5 - Espectrometria de massa

5.1 Fundamentos teóricos

A espectrometria de massa (MS) é uma metodologia analítica que permite a identificação de compostos desconhecidos, determinação da composição isotópica dos elementos numa molécula e determinação da estrutura de um composto pela observação da sua fragmentação, em função da razão massa-carga (m/z) de partículas carregadas na fase gasosa. Outras aplicações incluem a quantificação de um composto numa amostra.

Todos os espectrómetros de massa consistem em três unidades funcionais fundamentais e distintas e são elas: 1) a fonte de ionização (FI); 2) os analisadores de massa (AM); e 3) o detector de iões (**Figura II-16**). A amostra deve ser ionizada, uma vez que os iões são manipuláveis e moléculas neutras não. Os iões formados na FI são extraídos para a região do analisador, onde são separados de acordo com a sua razão m/z . Por fim, os iões separados são detectados e o seu sinal é enviado para um sistema de dados, que apresenta um espectro das razões m/z e da abundância relativa (intensidade) para cada valor detectado. Para cada unidade de um espectrómetro de massa estão disponíveis diferentes *designs*, os quais podem

ser dispostos de formas diversas. Em particular para os analisadores de massa, existem diferentes arranjos destas unidades que podem ser incorporados num único instrumento.

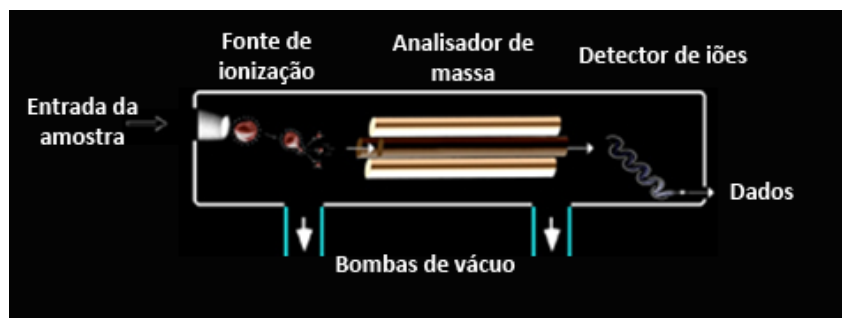


Figura II-16 – Componentes de um espectrómetro de massa. Os analisadores e detectores encontram-se sempre sobre vácuo constante, mas nem todas as fontes de ionização (exemplo: ESI e APCI encontram-se à pressão atmosférica). Adaptado de (6).

A identificação de proteínas que sofrem um processo de digestão enzimática é uma abordagem tradicional referida por *bottom-up*, baseada na identificação dos seus constituintes peptídicos. A identificação resulta da comparação das massas dos péptidos tripticos com aquelas previstas por bases de dados, ao que se chama PMF (do inglês, *peptide mass fingerprinting*). A estratégia de sequenciação de proteínas por *top-down* baseia-se na análise de proteínas intactas e fragmentação directa por tandem MS.

5.1.1 Métodos de ionização

A fonte de ionização foi pensada para gerar iões, quer por perda ou ganho de carga, e transferi-los para a fase gasosa, antes de prosseguir para análise. São várias as técnicas que hoje se podem indicar para a ionização de moléculas ou compostos para espectrometria de massa, mas no geral é preciso considerar sobretudo dois factores aquando a escolha de uma IF: 1) a transferência de energia interna durante o processo de ionização; e 2) as propriedades físico-químicas do analito que se pretende ionizar. Algumas técnicas são muito energéticas e por isso induzem uma extensa fragmentação. Porém, outras produzem apenas iões da espécie molecular. Com a introdução das chamadas técnicas de ionização *soft* foi possível transpor problemas como a decomposição térmica e fragmentação excessiva de grandes biomoléculas, como o caso das proteínas. A introdução destas técnicas de ionização veio revolucionar a análise de proteínas através da espectrometria de massa, tornando-o numa abordagem central no estudo, identificação e caracterização destas biomoléculas.

De seguida, uma descrição mais detalhada sobre o método de ionização MALDI (do inglês, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*), uma vez que os instrumentos de massa utilizados durante a execução do trabalho prático usavam esta fonte de ionização.

5.1.1.1 MALDI

A utilização do MALDI como fonte de ionização para espectrometria de massa tornou-se generalizada, em função da produção de iões na fase gasosa a partir de compostos não voláteis e termicamente instáveis tão variados como proteínas, oligonucleótidos, polímeros sintéticos e compostos inorgânicos.

Quanto ao método em si, é a aplicação de uma matriz que co-cristaliza com o analito que determina o sucesso do processo, uma vez que proporciona tanto a dessorção como a ionização (**Figura II-17**). A matriz contém compostos orgânicos com elevada absorção no comprimento de onda do laser, que facilitam a absorção e a transferência de energia do laser UV. A irradiação da mistura analito-matriz pelo laser induz a vaporização desta, que leva juntamente consigo o analito. Assim, as moléculas da amostra co-cristalizada também vaporizam, mas sem absorver energia directamente a partir do laser. Na fase gasosa os iões são acelerados por um campo eléctrico em direcção ao analisador de massa (De Hoffmann & Stroobant 2007). Como uma técnica de ionização já há muito considerada *soft*, o MALDI gera essencialmente iões intactos, ou seja, as moléculas de um determinado composto formam espécies monocarregadas $[M+H]^+$, onde M representa a massa da molécula.

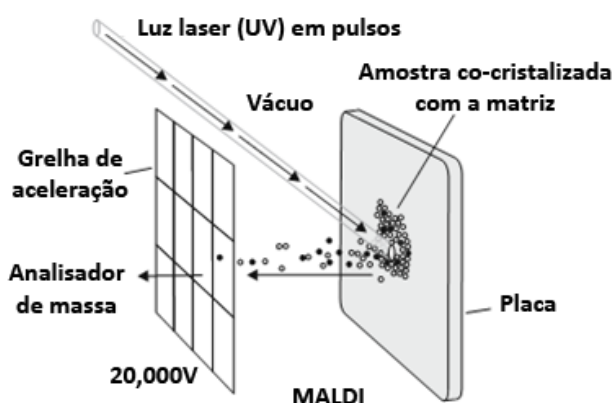


Figura II-17 – Representação da ionização por MALDI. No MALDI, a matriz e a amostra co-cristalizam numa placa, a qual é introduzida na fonte do espectrómetro de massa (em vácuo). Após a irradiação com pulsos do laser UV, as moléculas da amostra e da matriz sofrem dessorção da fase condensada, facilitando a vaporização e ionização. Uma vez na fase gasosa os iões são acelerados para fora da fonte e em direcção ao analisador de massa, pela aplicação de um campo eléctrico de elevado potencial. Adaptado de (Schuchardt & Sickmann 2007).

Existe uma gama vasta de compostos adequados para o uso como matriz, que cumprem determinadas especificações como as matrizes CHCA (do inglês, *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*) usado sobretudo para análise de péptidos e nucleótidos (Beavis et al. 1992); o DHB (do inglês, *2,5-dihydroxybenzoic acid*), com aplicação para péptidos, nucleótidos, oligonucleótidos (Strupat et al. 1991); o SA (do inglês, *sinapinic acid*) para estudar proteínas, péptidos e lípidos (Beavis & Chait 1989), entre outros. Uma solução destes compostos é feita de água do tipo I e solvente orgânico (normalmente acetoneitrilo), com a adição de ácido trifluoracético. A escolha de uma matriz adequada em função da amostra em estudo permite controlar a eficiência do processo de ionização.

5.1.2 Analisadores de massa (AM)

Todos os analisadores de massa usam a aplicação de forças de campos eléctricos e magnéticos em partículas carregadas para separá-las de acordo com a sua razão m/z .

Cada tipo de analisador tem propriedades particulares, aplicações, limitações e vantagens próprias. Porém, a escolha de um AM deve ser baseada na aplicação, custo, performance desejada e ainda disponibilidade, dado que não existe um AM ideal que seja bom para todo o tipo de aplicações. A performance de um analisador pode ser definida pela exactidão de massa, resolução, *mass range*, velocidade de scan e a capacidade de fazer tandem MS.

Entre os analisadores encontram-se quadrupolos, *ion traps*, *orbitraps*, TOFs e FT-ICR (do inglês, *Fourier-transform ion cyclotron resonance*).

5.1.2.1 TOF

Um espectrómetro de tempo de voo, TOF (do inglês, *Time-of-flight*) é um analisador de massa simples, consistindo apenas numa região aceleradora de iões, um tubo de voo sobre vácuo e um detector. Estes instrumentos são utilizados sobretudo em combinação com a ionização por MALDI, para a análise de grandes biomoléculas. O conceito de separação diz que todos os iões experimentam a mesma diferença de potencial durante a aceleração, pelo que vão ter a mesma energia cinética no início do tubo de voo. Assim as suas velocidades deverão depender apenas na sua massa e carga, pelo que a sua chegada ao detector é proporcional à sua massa: quanto maior a massa, mais demorado o percurso ao detector.

Para aumentar a resolução, os instrumentos TOF modernos recorrem ao uso de reflectrões (Karas & Hillenkamp 1988), que focam iões com o mesmo m/z mas diferente energia cinética. O reflectrão, que se encontra depois do tubo de voo, cria um campo onde os iões penetram de acordo com a sua energia cinética, e a profundidade que o ião atinge será tanto maior quanto esta energia. Os iões são reflectidos, onde derivam até ao detector. Para iões com o mesmo valor de m/z mas diferente energia cinética, a presença do reflectrão permitirá que estes alcancem o detector simultaneamente, melhorando a resolução (**Figura II-18**).

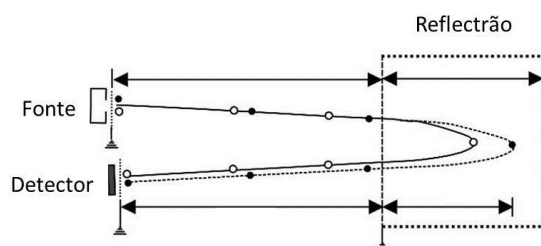


Figura II-18 – Esquema de um TOF equipado com um reflectrão. • - Iões de uma determinada massa com a energia cinética correcta. ○ = Iões com a mesma massa, mas energia cinética demasiado baixa. Este último atinge o reflectrão depois, mas sai antes e com a mesma energia cinética que o primeiro ião. Alcançam o detector ao mesmo tempo. Adaptado de (De Hoffmann & Stroobant 2007).

5.1.2.1.1 TOF-TOF

Tandem MS (ou MSMS) é uma técnica usada para produzir informação estrutural acerca de um composto através da fragmentação de iões específicos (ou da molécula intacta) e identificação dos fragmentos resultantes. Fazer tandem MS envolve vários passos de selecção intercalados com fragmentação das partículas carregadas seleccionadas. As várias fases de separação podem ser alcançadas com elementos individuais de um espectrómetro de massa, separados no espaço ou no tempo. Quando se recorre a um TOF-TOF, estes elementos encontram-se fisicamente separados (com uma ligação física para manter as condições de vácuo elevado). Num espectrómetro deste tipo e no modo de MSMS, o primeiro TOF isola os iões precursores, enquanto o 2º TOF analisa os fragmentos formados pela célula de colisões entre os dois analisadores (Vestal & Campbell 2005).

Uma das aplicações mais comuns da MS tandem é a sequenciação de péptidos (Roepstorff & Fohlman 1984; Roepstorff 1996) através da fragmentação do esqueleto peptídico.

5.1.2.2 FT-ICR

Este tipo de analisador oferece uma resolução e *mass accuracy* muito superior a outros AM. Os iões do analito são aprisionados por um campo eléctrico estático, movendo-se em orbitas circulares na presença de um campo magnético uniforme (**Figura II-19**). A frequência de movimento circular (frequência ciclotrónica) é uma função do valor de m/z do ião e da força do campo magnético. O raio do movimento circular é dependente do momento dos iões no plano perpendicular ao campo magnético, o que permite que em condições de elevado vácuo seja possível conter os iões por longos períodos de tempo com passos repetidos de excitação e detecção das suas frequências ciclotrónicas (Schuchardt & Sickmann 2007).

Uma característica particular do FT-ICR é a forma como a frequência do movimento é medida. Os analisadores de um FT-ICR não possuem um detector onde os iões colidem directamente como é o caso da maioria dos analisados de massa. Em vez disso, a detecção baseia-se na medição da imagem de corrente que pacotes de iões produzem quando passam repetidamente pelas placas detectoras num determinado intervalo de tempo.

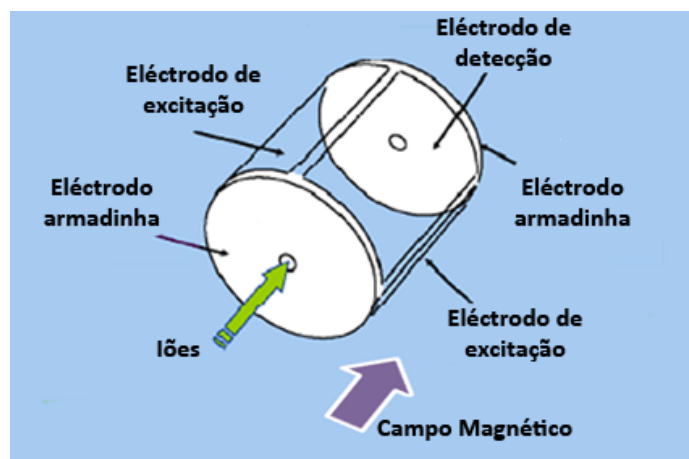


Figura II-19 - Representação de uma célula de FT-ICR. Cortesia de Bruker Daltonics, Bremen.

Na célula, todos os iões são excitados simultaneamente, medindo-se a corrente gerada. O sinal transiente formado é convertido em frequências utilizando um algoritmo de transformada de Fourier, e as frequências individuais são depois transformadas em valores de m/z . Este método de detecção é não destrutivo, pelo que os iões podem ser medidos por intervalos de tempo longos se necessário, o que aumenta a resolução instrumental (Heeren et al. 2004; M. P. Barrow et al. 2005).

5.1.3 Detectores

São o elemento final de um espectrómetro de massa. O detector regista a carga ou a corrente produzida quando um ião ou passa ou atinge a sua superfície. À excepção de Orbitraps e FT-ICRs, o detector de iões é normalmente destrutivo. Os iões são normalmente detectados por SEM (do inglês, *secondary electron multipliers*) ou por MCP (do inglês, *microchannel plate detectors*). Normalmente, o detector permite a formação de um sinal analógico através da produção de electrões secundários, os quais são amplificados. O sinal analógico do detector é convertido e processado por um computador. Existem outros *desings* e aplicações para a detecção de iões como os detectores foto-sensíveis (Schuchardt & Sickmann 2007; Peng et al. 2004).

5.2 Preparação e análise da amostra:

5.2.1 Digestão *in gel* das proteínas

Para minimizar as contaminações das amostras para identificação de proteínas por PMF, os passos que a seguir se descrevem foram realizados com luvas e bata.

As proteínas de plasma humano foram separadas em géis de SDS-PAGE 12%, com 1,0mm de espessura conforme descrito em secções anteriores. A banda correspondente ao monómero da TTR (na direcção do padrão de massa molecular de 15 kDa) foi removida com o auxílio de um bisturi. Para os géis 2D, os *spots* de interesse foram retirados com uma ponta de 1mL.

Os *spots* e/ou bandas são primeiro lavados com água do tipo I, seguindo-se lavagens em acetonitrilo (ACN) a 50% (Merck) para se remover o excesso de Azul de Coomassie (até 3 lavagens). Por fim, a desidratação com ACN a 100%. Cada passo de lavagem teve 10 minutos de duração, a 37°C com agitação. As bandas e/ou *spots* desidratadas foram guardadas a -20°C quando o processo de digestão não teve continuidade no mesmo dia.

Os passos de redução e alquilação não foram feitos porque 1) as proteínas dos géis 2D já se encontram reduzidas e alquiladas e 2) a TTR possui um único resíduo de cisteína em cada uma das suas subunidades mas que não participa em ligações persulfureto (Saraiva 2001).

5.2.2 Digestão com tripsina

As bandas ou *spots* foram re-hidratados em **Tampão de Digestão** (50mM NH_4HCO_3 e 6.7 ng/ μL tripsina) durante 45 minutos a 4°C. Removeu-se o tampão que não foi absorvido pelos pedaços de gel e adicionou-se NH_4HCO_3 para a digestão proceder O/N a 37°C. No final do procedimento, os digeridos e os fragmentos de gel foram separados e armazenados a -20°C.

O foi NH_4HCO_3 adquirido à Sigma e a tripsina à Promega.

5.2.3 Aplicação dos digeridos na placa de MALDI

A mistura de péptidos foi purificada, para a remoção de sais e outros possíveis contaminantes, e concentrada. Utilizaram-se colunas de cromatografia de fase reversa do tipo C8 (Poros reverse phase R2 – Applied Biosystems). O protocolo de preparação da coluna passou pela activação da resina com 50% ACN e equilíbrio e conservação da mesma numa solução com ácido trifluoracético (TFA) (Sigma) a 0,1%.

Para a purificação e eluição dos péptidos, primeiro elui-se o TFA, seguido da aplicação e eluição da amostra digerida. Após uma lavagem com 0,1% de TFA, aplica-se a **Solução de Matriz** (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de CHCA (Sigma) em 50% ACN com 0,1% TFA) e os péptidos são eluídos directamente para as placas de MALDI AnchorChip (Bruker Daltonics, Bremen) e Placa ABI 4800 MALDI TOFTOF.

5.3 Obtenção dos espectros de massa

Os digeridos de TTR foram analisados por MALDI-FT-ICR num espectrómetro de massa Bruker Apex Ultra Apollo II combi-source (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com um magneto de 7 Tesla (MagneX Corporation, Oxford UK). As massas dos picos monoisotópicos dos péptidos foram determinadas pelo programa Data Analysis (versão 3.4), através do algoritmo SNAP 2 (Bruker Daltonics). Estas foram depois submetidas ao programa da identificação de proteínas Mascot¹ (Matrix Science, London, UK) e analisadas com o *software* Biotoools 3.1 (Bruker Daltonics).

Para analisar os digeridos provenientes dos géis 2D e sequenciar alguns péptidos específicos da TTR por tandem MS recorreu-se a um MALDI-TOF-TOF 4800 Plus (Applied

¹ <http://www.matrixscience.com>

Biosystems). As análises de MSMS foram realizadas pelo Dr. Ricardo Gomes do ITQB, usando CID (do inglês, *collision induced dissociation*) com 1kV de energia de colisão a 1×10^6 torr de pressão. Para cada espectro de MSMS recolheram-se 2000 *laser shots*, com uma intensidade de laser fixa a 4000V. Os dados foram gerados pelo *software* 4000 Series Explorer v3.0 RC1 (Applied Biosystems) e analisados no Data Explorer 4.5 (Applied Biosystems).

5.4 Identificação das proteínas por PMF

Para a comparação das massas dos péptidos dos péptidos e identificação das proteínas correspondentes utilizaram-se base de dados como MSDB² (base de dados de sequências proteicas não idênticas) e UniProtKB/SwissProt³ (base de dados de sequências não redundantes de proteínas). Considerou-se um erro máximo de 5ppm.

5.5 Quantificação relativa das formas *wild-type* e mutante da TTR plasmática

Para proceder à quantificação relativa das variantes WT e V30M da TTR em circulação, a partir do programa Biotoools 3.1 (Bruker Daltonics), recolheram-se as intensidades monoisotópicas dos picos com m/z 1394.6178 e 1366.7556. Fez-se uma razão entre os valores destas intensidades e calculou-se a média para cada grupo em estudo. Tendo o grupo controlo como referência, calculou-se então a proporção de WT nos restantes indivíduos, dividindo a média da razão do grupo controlo pela média de cada grupo em estudo. A percentagem de TTR V30M é aferida a partir do valor de TTR WT determinado.

5.6 Análise estatística dos dados: teste t-Student

Para fins estatísticos, para os grupos de controlo, indivíduos assintomáticos e doentes não transplantados, utilizaram-se 3 replicados de origem biológica independente para considerar a variabilidade intrínseca, e 5 replicados experimentais para erros de natureza instrumental e humana, perfazendo 15 replicados por grupo de estudo. Por cada grupo de pacientes transplantados (DLT e CLT), utilizaram-se 4 origens biológicas diferentes, totalizando 20 replicados.

² <http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>

³ <http://www.uniprot.org>

Para comparar a significância da quantificação relativa das variantes de TTR, aplicou-se o teste t-Student com um intervalo de confiança de 95% aos valores das razões das intensidades dos picos acima mencionados. A comparação foi feita entre AS PAF, PAFNT e DLT e entre Controlos e CLTs. Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

III – RESULTADOS

1 - Quantificação da proteína total

A quantificação da proteína total nas amostras de plasma humano foi realizada segundo o método de Bradford. No gráfico da **Figura III-20** encontram-se as concentrações médias de proteína total no plasma dos grupos em estudo: indivíduos controlo, assintomáticos, doentes PAFNT e pacientes transplantados (Anexos, Tabela VII-8). Observou-se que a quantidade de proteína é inferior em indivíduos assintomáticos e PAFNT quando comparados com pessoas que não possuem mutações conhecidas para a TTR (controlos). Uma análise dos dados com o teste t-Student permitiu concluir que esta diferença é estatisticamente significativa ($p\text{-value} < 0,05$).

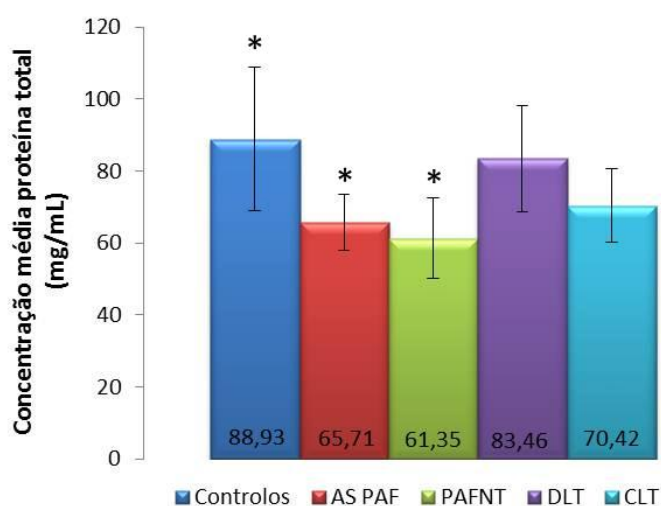


Figura III-20 – Concentração média da proteína total no plasma dos indivíduos não portadores de mutações conhecidas da TTR (controlos), portadores assintomáticos (AS PAF) e sintomáticos da mutação V30M da TTR (PAFNT) e pacientes transplantados com um fígado PAF (DLT) e com um fígado cadáver *wild-type* para a TTR (CLTs). * $p\text{-value} < 0,05$.

2 - Quantificação relativa das variantes *wild-type* e V30M da TTR no plasma de indivíduos assintomáticos, doentes e transplantados

No contexto das doenças amilóides, a formação dos intermediários amiloidogénicos é um processo dependente da concentração e do tempo (*in vitro*) e, de acordo com o modelo de polimerização dependente de nucleação, a agregação tem início apenas quando a concentração proteica atinge um ponto crítico (Estrada & Soto 2007; J. E. Kang et al. 2009).

A PAF é uma de várias doenças caracterizadas pela formação de fibras amilóides, sendo a TTR o principal componente encontrado nos seus depósitos. Atendendo o modelo que reúne maior concordância para explicar a sua patogénese - relaciona a estabilidade do tetrâmero de TTR com mutações pontuais ao longo da cadeia polipeptídica desta proteína (Hurshman et al. 2004) -, e que a maioria dos indivíduos paramiloidóticos são portadores heterozigóticos para uma mutação da TTR, torna-se clara a necessidade de determinar a razão entre as variantes *wild-type* e mutantes da TTR em circulação.

Recorrendo a uma abordagem baseada na espectrometria de massa de elevada resolução, determinou-se a relação das formas da TTR plasmática (*wild-type* e V30M) em indivíduos portadores da mutação, assintomáticos e sintomáticos, assim como pacientes sujeitos a uma intervenção cirúrgica: pacientes PAF que receberam um fígado *wild-type* de cadáver (CLTs) e pacientes que sofriam de doenças hepáticas graves e receberam um fígado de um doente PAF (DLTs).

2.1 Separação da TTR e identificação por Western blot

Muito do trabalho em estudos de proteómica incide na separação prévia das proteínas de interesse como um dos passos mais importantes para uma análise livre de contaminantes. Embora a imunoprecipitação seja um método utilizado por alguns investigadores para obter amostras mais enriquecidas nas proteínas de interesse, nomeadamente para proteínas do plasma (Théberge et al. 2000; Théberge et al. 2011), requer vários passos de optimização, sacrificar grandes volumes de amostra e de anticorpos. Dado o factor limitante da amostra, decidiu-se realizar a separação das proteínas plasmáticas através de uma electroforese SDS-PAGE convencional. Além de uma abordagem simples e rápida, requer quantidades muito pequenas de proteína para a detecção da proteína de interesse e, no presente caso, a TTR encontra-se visivelmente isolada em relação a outras bandas (**Figura III-21**). Este método de

separação assegura ainda a remoção de impurezas de baixa massa molecular, incluindo detergentes, que muitas vezes são prejudiciais à análise por espectrometria de massa. Outra vantagem é o facto da matriz de poliacrilamida ser um recipiente seguro para manusear, derivatizar e armazenar pequenas quantidades de proteínas (Shevchenko 2001; Shevchenko et al. 2001; Aebersold & Mann 2003), pelo que a digestão *in-gel* de proteínas é um suporte fundamental na espectrometria de massa.

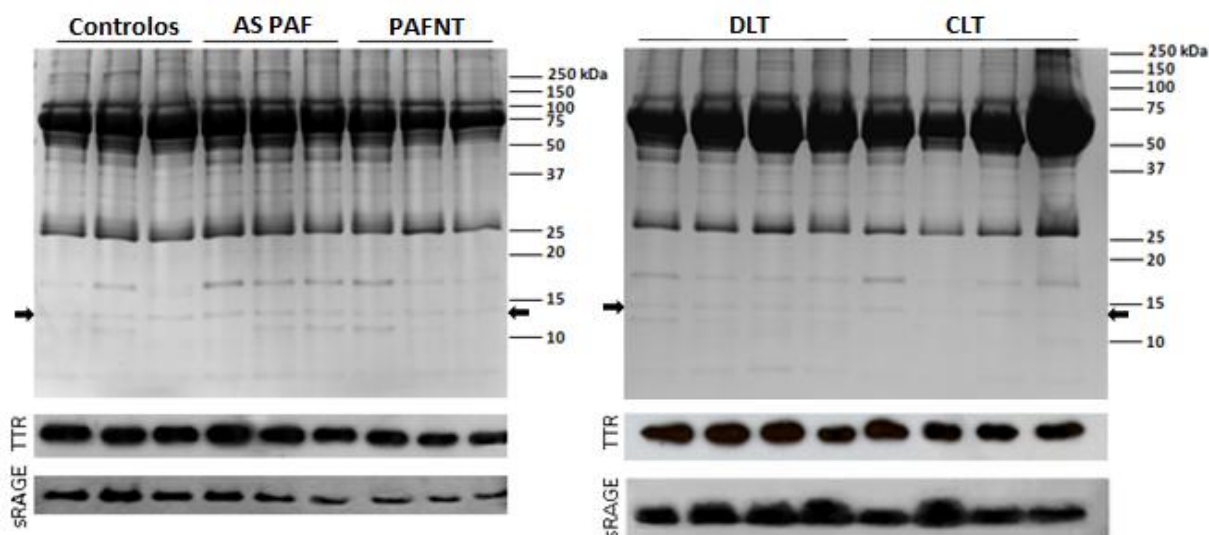


Figura III-21 – Análise das proteínas do plasma por SDS-PAGE, Coloração com o Azul de Coomassie (topo) e Western blot do monómero da TTR e do sRAGE (em baixo). À esquerda, Controlos, indivíduos assintomáticos e sintomáticos da PAF não transplantados. À direita, quatro pacientes DLT e quatro CLT. As setas no gel SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie indicam a banda da TTR (monómero) que foi removida para análise por MS, identificação e caracterização da TTR.

Na **Figura III-21** encontram-se os perfis electroforéticos das amostras de plasma analisadas em géis SDS-PAGE, onde é possível observar que não se registam variações no perfil electroforético, mas também da proteína total (aferido a partir da coloração pelo Azul de Coomassie), quer entre grupos quer entre indivíduos. Igualmente os níveis de TTR total (sob a forma de monómero) não parecem variar de indivíduo para indivíduo e entre os vários grupos, como se pode notar nos westerns da mesma figura. Esta afirmação é suportada pelo Western blot contra as isoformas da proteína RAGE que têm em falta os domínios transmembranares e de sinalização (referidas como RAGE solúvel ou sRAGE), usado como *loading control* (a sua quantidade em circulação não é afectada pela condição estudada, e os seus níveis nas amostras analisadas são invariantes).

Em géis SDS-PAGE a TTR apresenta-se não só na forma monomérica como na forma dimérica (Thylén et al. 1993). Com o objectivo de avaliar a relação entre a quantidade destas

duas espécies nos géis SDS-PAGE, calculou-se a sua contribuição de sinal a partir de um western contra a TTR recorrendo ao *software* Phoretix 1D (Figura III-22).

Com a análise efectuada, foi possível determinar que num gel SDS-PAGE aproximadamente 90% da TTR se encontra na forma de monómero. Conclui-se que a TTR dimérica num gel SDS-PAGE apresenta uma contribuição quase residual e que, uma vez que a variação da proporção entre as duas espécies proteicas de *lane* para *lane* é insignificante, não influencia a quantificação relativa entre a TTR *wild-type* e mutante.

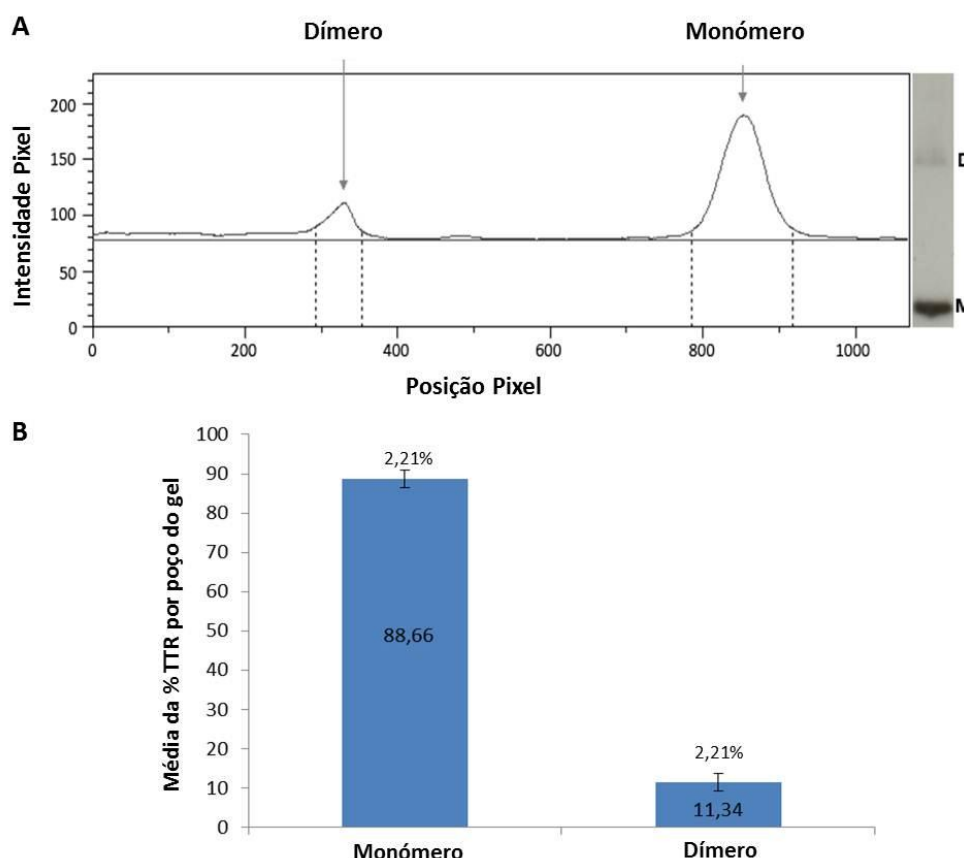


Figura III-22 – Análise comparativa da TTR monomérica e dimérica em géis SDS-PAGE. A) Distribuição da intensidade do pixel ao longo de uma *lane* a partir de uma análise de Western blot. D e M indicam o dímero e monómero na *lane* do Western blot, respectivamente. **B)** Representação gráfica da média e valores de desvio-padrão do monómero e dímero de TTR nas bandas dos géis, como determinado com recurso ao Phoretix 1D (TotalLab Ltd).

2.2 Identificação da TTR *wild-type* e V30M por *Peptide mass fingerprint* (PMF)

Foi possível cobrir cerca de 60% da sequência da TTR extraída a partir das bandas dos géis, com correspondência de 8 péptidos em 11 com um desvio inferior a 5 ppm e uma identificação significativa pelo MASCOT, com um *score* de 146 (considera-se que para as

condições usadas o *score* para uma identificação significativa é superior a 76). Na **Tabela III-4** encontram-se anotados alguns dos péptidos identificados por PMF, dentro da gama de valores *m/z* de interesse.

A detecção do péptido contendo o local da mutação permitiu discriminar entre as variantes *wild-type* e V30M da TTR. O pico 1366.7556 *m/z* corresponde ao péptido *wild-type* com a sequência GSPAINVAVHVFR, e encontra-se presente em todos os indivíduos testados. Por outro lado, o pico com *m/z* de 1398.7279 correspondente à variante mutada e é coincidente com o aumento de massa teórico de 32.056 Da resultante da substituição V30M (GSPAINVAMHVFR). Encontra-se presente apenas em indivíduos heterozigóticos que apresentam em circulação uma mistura das variantes mutadas e *wild-type* (**Tabela III-4** e **Tabela II-1**).

Tabela III-4 – Identificação da Transtirretina por PMF MALDI-FT-ICR MS. Massa e sequência dos péptidos identificados nas amostras de plasma de Controlos, AS PAF, PAFNT, DLT e CLT, dentro da gama de valores de *m/z* de interesse. M* - metionina oxidada.

[M+H] ⁺ (obs)	[M+H] ⁺ (teo)	ppm	Sequência		C	AS PAF	PAF NT	CLT	DLT	
1366.7556	1366.7590	2	[22-34]	GSPAINVAVHVFR	+	+	+	+	+	Péptido <i>wild-type</i> : contém local mutação
1394.6178	1394.6223	3	[36-48]	AADDTWEPFASGK	+	+	+	+	+	Péptido comum
1398.7279	1398.7311	2	[22-34]	GSPAINVAMHVFR	-	+	+	-	+	Péptido mutante
1414.7227	1414.7260	2	[22-34]	GSPAINVAM*HVFR	-	+	+	-	+	Péptido mutado com oxidação da metionina
1494.8513	1494.8540	3	[22-35]	GSPAINVAVHVFRK	+	+	+	+	+	<i>Miscleavage</i> péptido <i>wild-type</i>
1526.8193	1526.8260	4	[22-35]	GSPAINVAMHVFRK	-	+	+	-	+	<i>Miscleavage</i> péptido mutante

A presença da mutação (V30M) é suportada pela observação de um outro pico a 1414.7227 *m/z*. Este resulta da oxidação da metionina no péptido mutado, que leva a um aumento de massa de 15,994 Da (**Figura III-23**). Foram também identificados péptidos equivalentes aos péptidos *wild-type* e mutado, mas com uma *miscleavage*: 1494.8512 e 1526.8193 *m/z*, respectivamente.

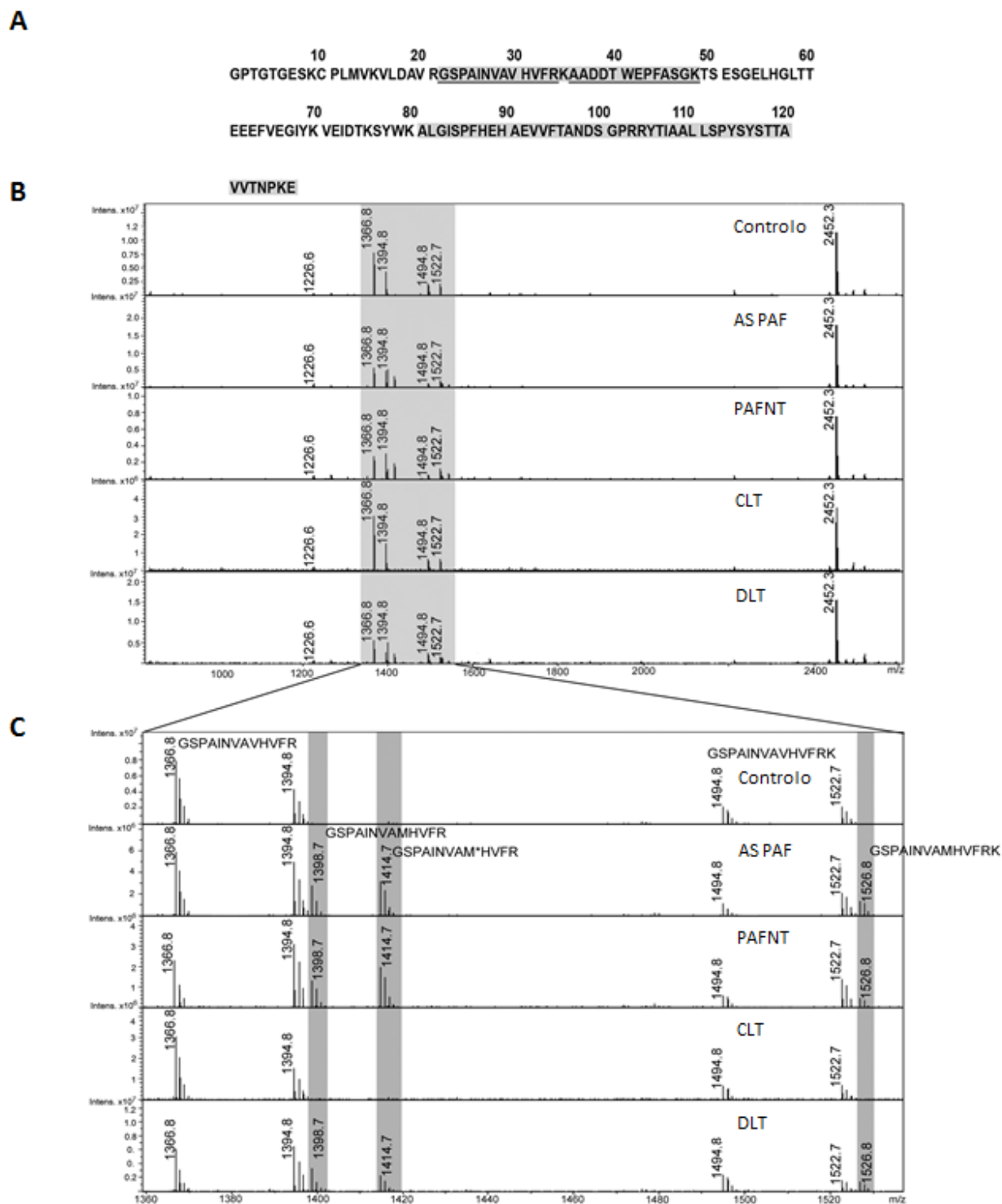


Figura III-23 – Espectros da análise de PMF por MALDI-FT-ICR após digestão das bandas de TTR das amostras de plasma. A) Cobertura de sequência da TTR *wild-type* com os péptidos identificados por PMF assinalados a cinzento e a sublinhado encontra-se os que foram sequenciados por tandem MS. **B)** Zoom completo dos espectros de MS representativos dos dados adquiridos para cada grupo de amostras. **C)** Zoom in da região marcada a cinzento em B). O ião 1366.7556, presente em todos os indivíduos, corresponde ao péptido de sequência $G^{22}SPAINVAV^{30}HVFR^{34}$. O ião 1398.7279 está presente apenas em AS PAF, PAFNT e pacientes DLT. Este ião corresponde ao péptido com a sequência $G^{22}SPAINVAM^{30}HVFR^{34}$. O ião com 1394.6178 corresponde ao péptido utilizado como referência. Os picos com 1494.8513 e 1526.8193 m/z correspondem aos péptidos WT e mutados com uma *miscleavage*, respectivamente. O péptido mutado com uma oxidação na metionina corresponde ao pico de 1414.7227. M* - metionina oxidada.

Na **Figura III-23** podemos ainda observar que o péptido *wild-type* (1396.7556), assim como a sequência correspondente com uma *miscleavage*, encontra-se em todos os espectros. No entanto, os picos referentes ao péptido mutado (1398.7279, 1414.7227 e 1529.8193 m/z) estão apenas presentes nos espectros de indivíduos PAF assintomáticos/sintomáticos e em pacientes DLT. Por outro lado, em doentes CLT não se observam estes péptidos mutantes, o que aponta para a rápida eliminação da TTR mutada em circulação, a qual é substituída pela forma produzida no fígado que é transplantado, conforme documentado (Holmgren et al. 1991). Assim, pouco tempo após um transplante de fígado cadáver, os pacientes CLT possuem apenas TTR *wild-type* no plasma, enquanto aqueles que receberam um fígado PAF (pacientes DLT), apresentam os péptidos mutados pouco tempo após a intervenção cirúrgica.

2.2.1 Análise dos péptidos trípticos identificados por MSMS

Apesar da *mass accuracy* reportada (inferior a 5 ppm) e da identificação da TTR com uma cobertura de sequência de 60%, realizou-se uma análise de MSMS de forma a assegurar a identidade atribuída aos péptidos usados para a quantificação relativa de TTR *wild-type* no plasma: os péptidos com m/z de 1366.7556 e 1394.6178. Também se procedeu à análise do péptido mutado (1398.7279 Da), que compreende a mesma região que o péptido 1366.7556, para confirmar a substituição da valina na posição 30 por uma metionina.

Os dados de MSMS na **Figura III-24** confirmam a sequência dos péptidos mencionados, assim como a substituição no péptido mutado, dada a diferença média de massa entre os iões y4, y5 e y6 no espectro de 32.056Da, equivalente à troca da valina pela metionina. Assim, garantiu-se a informação adicional que os péptidos correctos estão a ser usados para fins quantitativos. Os espectros de MSMS representados foram obtidos pelo Dr. Ricardo Gomes – ITQB.

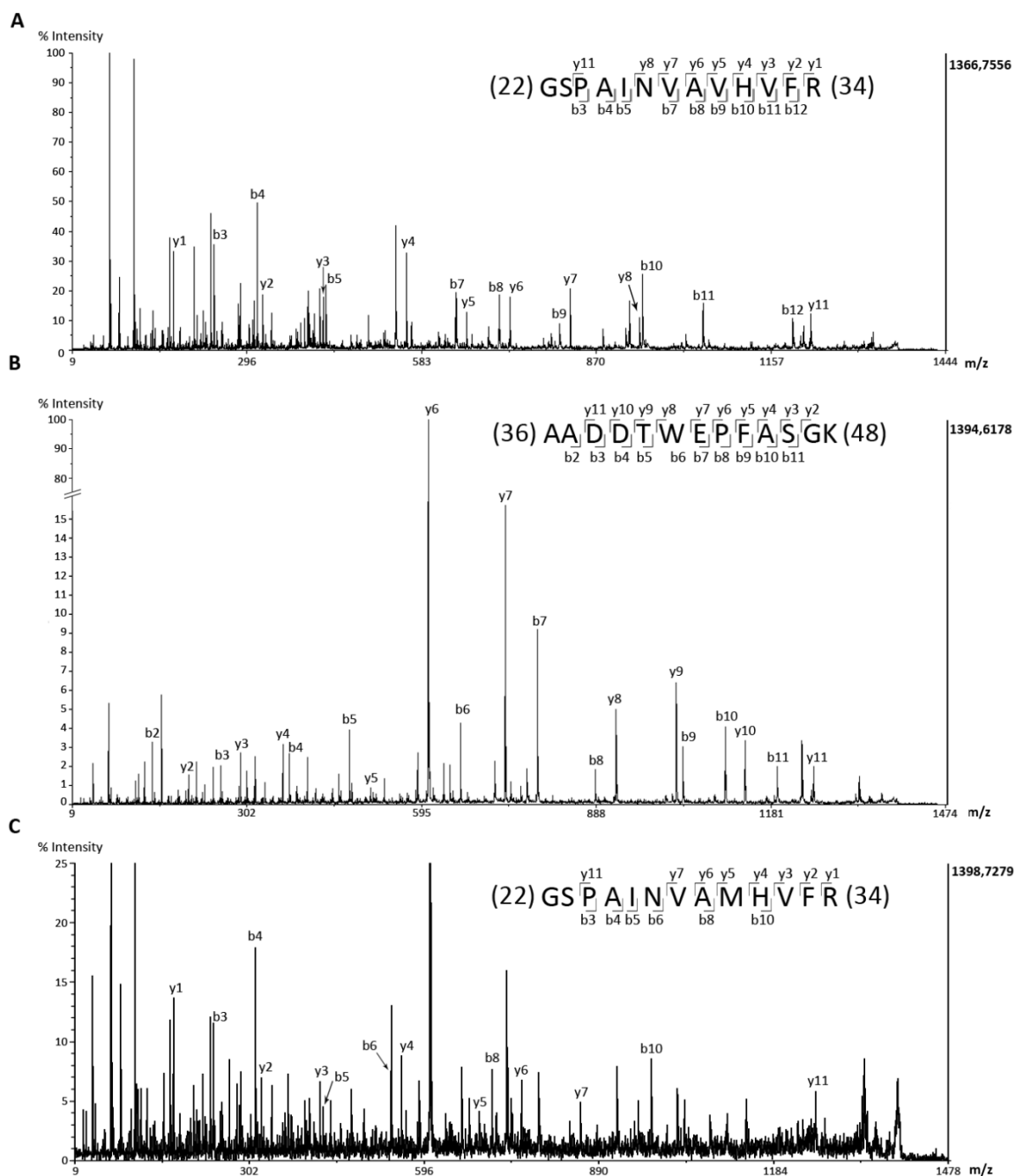


Figura III-24 – Sequência dos peptídeos exclusivos da TTR *wild-type*, V30M e peptídeo comum a ambas as variantes. Espectro CID MSMS do **A)** pico 1366.7556 m/z, GSPAINVAVHVF [22-34]; **B)** pico 1394.6178 m/z, AADDTWEPFASGK, [36-48]; e **C)** pico 1398.7279 m/z, GSPAINVAMHVF [22-34]. As séries dos íons b e y observados a partir do CID estão identificados em cada sequência.

2.3 Quantificação relativa das variantes *wild-type* e V30M no plasma

A intensidade de um pico num espectro de massa de uma única substância em comparação à intensidade de uma referência pode ser utilizada para quantificar proteínas (R. W. Nelson et al. 1994), oligonucleótidos (K. Tang et al. 1993), peptídeos (Jespersen et al. 1995) e

outros compostos de baixa massa molecular (Persson et al. 2000), e mostra uma relação linear com a quantidade de analito aplicado (Hochleitner et al. 2005; H. Zhang et al. 2005; Pan et al. 2005).

Neste contexto, e como previamente descrito (G. da Costa et al. 2009; G. da Costa et al. 2010), o método baseia-se no cálculo da razão das intensidades monoisotópicas entre picos referentes a um péptido único da TTR *wild-type* e um péptido que seja comum a ambas as formas (WT e V30M). Assim, usaram-se as intensidades monoisotópicas relativas dos picos com m/z 1366.7556 (péptido TTR *wild-type*) em relação a um péptido de TTR presente em todos os espectros de massa adquiridos (como o pico 1394.6178 m/z) para determinar a quantidade relativa da variante *wild-type* de TTR em cada uma das amostras e a partir deste valor, inferir sobre a variante V30M.

Seria possível também utilizar directamente o pico referente ao péptido mutado (1398.7279 m/z) para a quantificação relativa, porém a presença de uma metionina na sua sequência apresenta um grande inconveniente. A oxidação da metionina é um processo não controlado cuja extensão pode variar amplamente entre análises diferentes, e as cadeias laterais oxidáveis de aminoácidos mostram eficiências de ionização diferentes. Como estas ocorrências dificultam a comparação das intensidades dos picos dos péptidos com metionina, incluindo a sua forma oxidada, a escolha do péptido de referência para quantificação caiu sobre o pico de m/z 1394.6178. Este é um péptido que não compreende a região da mutação em estudo logo, em amostras de portadores heterozigóticos, a sua intensidade será uma contribuição das duas variantes de TTR: V30M e *wild-type*. Além disso, apresenta propriedades muito semelhantes no que toca à composição e massa molecular, pelo que se não se esperam grandes diferenças quer nas propriedades de ionização extracção do gel, quer na passagem pelas microcolunas cromatográficas no passo de lavagem e concentração da amostra. Como este péptido produz ainda um sinal na mesma gama de valores de m/z que o péptido *wild-type* apresenta uma forma mais simples e segura de quantificação. Com recurso a um péptido desta natureza (com origem em ambas as variantes da proteína em estudo), espera-se ainda eliminar a variabilidade biológica intrínseca e realizar uma quantificação relativa das duas variantes em heterozigóticos, embora a quantidade global de TTR no plasma pareça ser constante entre os vários indivíduos, conforme observado na **Figura III-21**.

Comparando a intensidade relativa do pico 1366.7556 m/z com a do pico 1394.6178 m/z , rapidamente se observou que a do primeiro é menor em indivíduos PAF relativamente aos controlos, o que sugere uma quantidade inferior de TTR *wild-type* nestes pacientes. Ao

comparar as intensidades relativas e as razões entre elas (**Tabela III-5**, ver Anexo Figura VII-33), determinou-se que no plasma de indivíduos AS PAF, PAFNT e DLT existe aproximadamente 60% de TTR *wild-type* contra 40% da variante V30M. Para os efeitos de quantificação, considerou-se o valor médio da razão das intensidades dos controlos como referência, uma vez que não possuem a proteína mutada (**Tabela III-6**).

Tabela III-5 – Quantificação relativa da TTR *wild-type* e V30M em amostras de plasma por PMF MALDI-FT-ICR MS. Estão indicados os valores médios das razões efectuadas entre as intensidades monoisotópicas dos picos 1394.6178 e 1366.7556 m/z. SD – desvio-padrão. Foram utilizados 5 replicados técnicos para cada uma das 3 amostras biológicas de cada grupo de estudo.

	Média razão (1394.6178/1366.7556)	DP
Controlos	0.365	0.067
AS PAF	0.619	0.105
PAFNT	0.597	0.104
DLT	0.648	0.092
CLT	0.383	0.083

Através desta análise comparativa, foi possível ainda verificar que a relação determinada entre as duas variantes de TTR no plasma não varia com o tempo após o transplante em pacientes DLT (ver Anexo Figura VII-33), independentemente da quantidade total da TTR em circulação, a qual também não varia, como mostra a **Figura III-21**. Por outro lado, observou-se em doentes que receberam um fígado cadáver *wild-type* (CLT) que a proporção da proteína não mutada é idêntica à do grupo controlo, isto é, aproximadamente 100% (**Tabelas III-5 e III-6**). Esta observação vai ao encontro do que se mencionou anteriormente: em indivíduos CLT não se detecta TTR mutada em circulação, uma vez que é rapidamente eliminada e substituída pela proteína produzida pelo fígado transplantado.

Tabela III-6 – Quantificação relativa das variantes *wild-type* e V30M da TTR em amostras de plasma por PMF MALDI-FT-ICR MS. As quantidades relativas da TTR WT e V30M nos grupos em estudo foram determinadas como a razão entre o grupo controlo e os restantes. *, ** *p-value* > 0.05. Esta diferença não é considerada estatisticamente relevante, num intervalo de confiança de 95%. Foram utilizados 5 replicados técnicos para cada uma das 3 amostras biológicas de cada grupo de estudo.

TTR variant	Controls *	AS FAP **	FAPNT **	DLT **	CLT *
WT	100%	59.7	61.9	64.8	≈100%
V30M	-	40.3	38.1	35.2	-

O teste t-Student aplicado aos dados leva a concluir que não existem diferenças significativas nas proporções determinadas para os grupos AS PAF, PAFNT e DLT, nem tão pouco diferenças entre o grupo controlo e os pacientes CLT.

3 - A glicação na PAF: análise dos níveis de glicação proteica no plasma e comparação da expressão de proteínas relacionadas com AGEs

São várias as observações fenotípicas da PAF que não encontram explicação no modelo aceite para a patogénese desta doença (como uma *age onset* muito variável e a existência de estados assintomáticos permanentes), o qual falha também no esclarecimento da formação das fibras amilóide de TTR. Embora esteja bem documentada o papel da mutação neste processo de amiloidogénese, é cada vez mais evidente a influência de factores adicionais não genéticos. Acredita-se que a elucidação sobre o envolvimento de factores não genéticos, como interacções com ligandos ou modificações pós-traducionais, possibilite respostas para estas questões ainda em aberto.

A glicação proteica é uma modificação pós-traducional que surge em patologias amilóides/doenças conformacionais como a Alzheimer e Parkinson. Foi demonstrado por Gomes *et al* a presença de Argpirimidina nas fibras amilóides de doentes, o primeiro indício de que a glicação mediada pelo metilglioxal está envolvida na PAF e que poderá desempenhar um papel relevante nesta patologia (Gomes et al. 2005). Posteriormente, foi também demonstrado que proteínas do plasma encontram-se diferencialmente glicadas por este dicarbonilo na PAF, sendo um dos principais alvos de glicação o Fibrinogénio (G. da Costa et al. 2011).

Recorrendo à técnica de Western blot tentou-se avaliar os níveis de glicação plasmática derivada do metilglioxal em indivíduos controlo, assintomáticos e indivíduos PAFNT, assim como o envolvimento de algumas proteínas que podem estar relacionadas com AGEs.

3.1 Níveis de glicação diferenciais entre indivíduos assintomáticos e doentes PAF não transplantados

Na **Figura III-26** estão representados os westerns realizados contra os produtos de glicação de glicação estudados. Embora a Argpirimidina (AGP) tenha sido usado como marcador específico para determinar os níveis de glicação pelo metilglioxal, investigou-se a presença de outros aductos, como o caso da Tetrahidropirimidina (THP).

Usando a argpirimidina como marcador específico da glicação de proteínas pelo metilglioxal. Nos westerns contra a AGP (**Figura III-25-A**) foi possível observar diferenças consideráveis nos três grupos em estudo. Embora já tenham sido documentados níveis de glicação aumentados em indivíduos sintomáticos portadores da mutação, esta é a primeira vez que é feita a comparação simultânea com indivíduos controle e portadores assintomáticos. Observou-se que embora sejam detectadas proteínas glicadas em todos os indivíduos, em estádios assintomáticos os níveis de Argpirimidina são semelhantes aos dos controles, encontrando-se aumentados em doentes PAFNT. Isto é particularmente evidente nas bandas de proteína com uma massa molecular de 20-25 KDa, que mostram um sinal forte para a AGP apenas no plasma de pacientes PAF. É ainda de notar que as proteínas normal e diferencialmente glicadas apresentam um padrão semelhante nos indivíduos dos 3 grupos de estudo, evidenciando uma glicação proteica no plasma homogênea e específica.

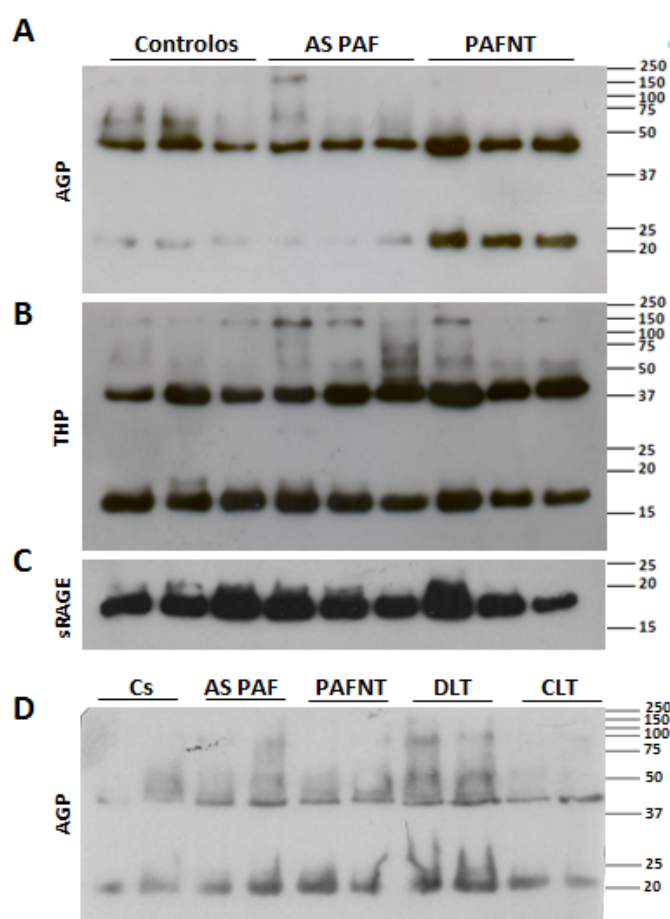


Figura III-25 – Análise por Western blot dos níveis de glicação derivada do Metilglioxal: A) Argpirimidina (AGP) e B) Tetrahidropirimidina (THP) como aductos de glicação. C) sRAGE como *loading control*. D) Comparação dos níveis de AGP em controles, assintomáticos, doentes PAFNT e pacientes transplantados DLT e CLT.

Em relação à THP (**Figura III-25-B**), o sinal que se observa é idêntico para todos os indivíduos: controlos, indivíduos assintomáticos e sintomáticos. Uma vez que este aducto não é o principal produto de glicação derivado do metilglioxal *in vivo* (Ahmed & Thornalley 2002), considerou-se que os resultados observados apontam apenas para níveis basais de glicação nos grupos de estudo, pelo que não são relevantes no âmbito da PAF.

Aquando da introdução do transplante hepático como a única terapia que impede a progressão da doença e posterior implementação do transplante de fígado dominó, esperava-se que os pacientes sujeitos a esta última intervenção dispusessem de longos períodos de tempo sem a formação de fibras amilóides. Porém, foram já reportadas várias situações em que o aparecimento de sintomas PAF em pacientes DLT (que receberam fígado PAF) se deu precocemente (Takei et al. 2007). Costa *et al* (G. da Costa et al. 2011) relacionaram a estabilidade do tetrâmero da TTR com os níveis de glicação nestes doentes, argumentando um aumento da glicação com o tempo após transplante coincidente com a perda da estabilidade desta proteína. Simultaneamente observaram que pacientes CLT apresentavam níveis de glicação basais e constantes com o tempo sem perda de estabilidade da TTR a ser produzida pelo novo fígado.

Atendendo a estas observações, decidiu-se comparar os níveis de AGP no plasma de indivíduos transplantados (2 e 26 meses após a intervenção) com os níveis de glicação de controlos, assintomáticos e sintomáticos (**Figura III-25-D**). Conforme observado anteriormente para doentes PAF não transplantados, que mostram um maior sinal para a AGP que controlos e sintomáticos, o mesmo acontece para pacientes DLT. Por outro lado, doentes CLT evidenciam níveis de glicação inferiores, comparáveis com os dos controlos e assintomáticos. Em indivíduos transplantados o padrão de glicação (normal e diferencial) que se observa é semelhante ao dos restantes, realçando uma vez mais a especificidade e homogeneidade da glicação proteica no plasma.

3.2 A PAF e os sistemas de defesa anti-glicante: Glioxalases e Aldose Reductase

As proteínas que foram alvo do estudo de expressão por Western blot em indivíduos assintomáticos, doentes PAFNT e pacientes transplantados foram a TTR, o Fibrinogénio (FIB), o Glioxalase I (Glo1) e o Aldose Reductase (AR).

Podemos observar que o sinal correspondente ao monómero da TTR é idêntico no plasma dos vários indivíduos testados nos westerns A) e B) da **Figura III-26**. Em relação ao FIB, proteína identificada como interactuante da TTR e um dos principais alvos de glicação na PAF (G. da Costa et al. 2011), apresenta variações consideráveis dentro dos grupos estudados. Embora assintomáticos mostrem um sinal menos intenso para o Fibrinogénio, sobressai uma intensidade de sinal dos doentes PAF não transplantados claramente superior aos controlos e assintomáticos, assim como pacientes DLT mostram um sinal mais elevado em relação a doentes CLT.

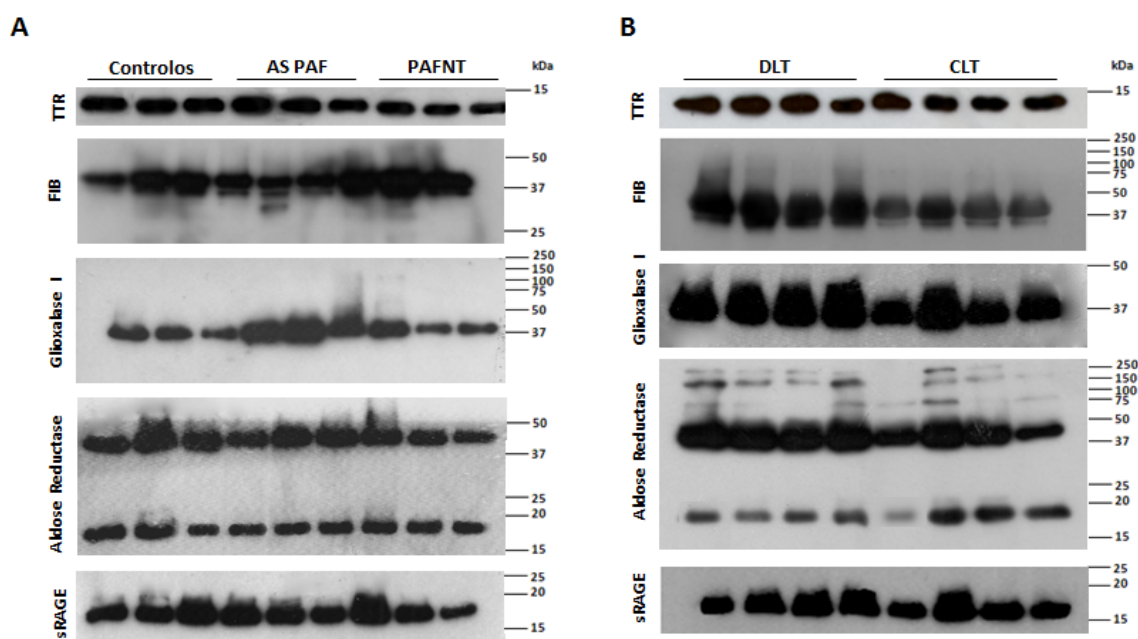


Figura III-26 – Comparação da expressão de algumas proteínas relacionadas com a glicação em A) controlos, assintomáticos e doentes PAFNT e B) em pacientes transplantados: TTR, Fibrinogénio (FIB), Glialase I, Aldose Reductase e sRAGE (loading control).

Os enzimas Glialase I e Aldose Reductase representam vias importantes que metabolizam o metilglioxal em compostos não tóxicos e não reactivos mantendo os níveis de MGO em concentrações reduzidas e não nocivas para o organismo. Na **Figura III-26-A** observa-se uma expressão aumentada do enzima Glo1 em indivíduos assintomáticos em relação aos doentes PAFNT, os quais apresentam níveis de glicação superiores quando comparados com os primeiros. Também em pacientes transplantados (**Figura III-26-B**) existe uma diferença óbvia na quantidade deste enzima: aqueles que receberam um fígado PAF têm níveis aumentados em comparação a doentes que receberam um fígado saudável. Para interpretar as observações sobre a expressão destes enzimas, procurou-se determinar as actividades do Glo1, Glo2 e AR no plasma. Porém, não se conseguiu alcançar este objectivo, dadas as quantidades vestigiais destas proteínas no plasma e a necessidade de usar grandes volumes de

amostra para otimizar o processo de doseamento da actividade enzimática. Seria preferível efectuar a determinação da actividade enzimática em eritrócitos, mas até à altura não se conseguiram ainda realizar novas colheitas de sangue para o isolamento destas células envolvendo indivíduos assintomáticos.

Pequenas discrepâncias inter-indivíduos nos níveis das proteínas analisadas podem dever-se à quantidade total de proteína, não estando relacionadas com a condição em estudo, como se pode constatar pela observação e comparação com *loading control* sRAGE.

4 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas no plasma de indivíduos assintomáticos e doentes PAF não transplantados por electroforese bidimensional

Conforme foi referido algumas vezes ao longo da apresentação deste trabalho, a PAF é uma patologia que embora se enquadre na categoria de doenças amilóides, apresenta características fenotípicas que à data se encontram por esclarecer. Algumas destas questões deparam-se com diferentes *age onset*, os padrões de deposição das fibras amilóides e níveis de penetrância que diferem mesmo em indivíduos portadores para a mesma mutação da TTR. Alguns portadores permanecem em estados assintomáticos ao longo de uma vida. Um conjunto de factores para além da mutação da TTR devem pois ter um papel importante no mecanismo de formação de amilóide, e o que distingue este dois grupos de indivíduos a nível proteico surgiu como alvo de interesse. Esta foi a razão pela qual se fez um estudo comparativo do proteoma total do plasma de indivíduos assintomáticos, doentes e controlos com o intuito de encontrar diferenças relevantes que possam estar envolvidas na patogénese da doença e dessa forma explicar algumas das discrepâncias observadas.

Para cumprir estes objectivos, recorreu-se à separação das proteínas plasmáticas de indivíduos assintomáticos, controlos e doentes PAFNT por electroforese bidimensional. Recorrendo a um *software* de análise 2D próprio, identificaram-se os *spots* diferencialmente expressos, os quais foram analisados por espectrometria de massa para a identificação das proteínas presentes.

4.1 Análise dos géis 2D com o *software* Progenesis SameSpots: identificação dos *spots* diferencialmente expressos

Com o *software* de análise de imagens 2D, Progenesis SameSpots, é possível comparar os géis dos vários grupos em estudo. Como já explicado no capítulo II (Materiais e Métodos), o programa faz um alinhamento entre os *spots* dos géis e uma análise estatística do seu volume, permitindo identificar proteínas que possam estar diferencialmente expressas na amostra testada.

Recorrendo a uma análise PCA, é possível observar o comportamento dos géis: a sua distribuição, se existem *outliers* e a qualidade/validação dos replicados feitos para cada amostra. Embora o gráfico da análise PCA não estipule o volume global dos *spots* para cada

gel, é alusivo quanto à variação da expressão proteica duma perspectiva meramente qualitativa.

Na **Figura III-27** apresenta-se o resultado da análise PCA dos géis. Conforme esperado, observa-se uma separação dos dados em três grupos distintos (controlos, assintomáticos e doentes) e não em apenas dois (controlos vs portadores as/sintomáticos), reforçando a hipótese de que existem diferenças entre indivíduos assintomáticos e doentes PAFNT que devem ser exploradas. Porém, para proceder a esta análise foram necessários alguns replicados quer experimentais (n=5) quer de origem biológica (n=3), dos quais 2 foram desprezados de cada um dos grupos de estudo, uma vez que se apresentavam afastados do grupo ao qual pertenciam (como *outliers*), dificultado o estudo comparativo.

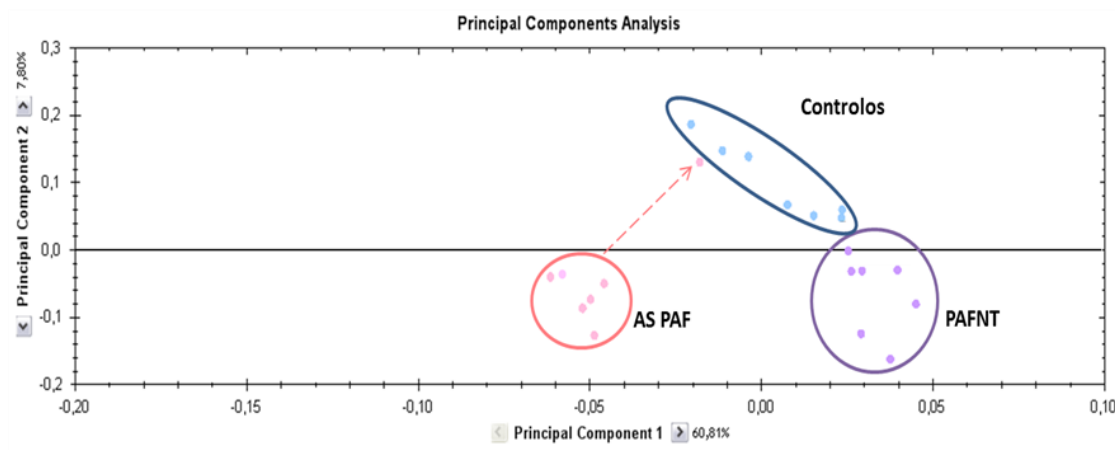


Figura III-27 – Gráfico da análise dos PCAs (do inglês, *principal component analysis*) dos géis 2D de controlos, assintomáticos e doentes PAFNT. Cada ponto no gráfico indica um gel: rosa – indivíduos assintomáticos; azul – controlos; e roxo – doentes PAF não transplantados. O agrupamento das amostras em função do volume global dos *spots* nos géis é coincidente com a sua origem biológica. Fizeram-se 3 replicados técnicos por cada amostra biológica, e dos 9 géis existentes por grupo de estudo utilizaram-se apenas 7.

Com base nesta análise, efectuada pelo Dr. Ricardo Gomes (ITQB), foram identificados 57 *spots* (indicados na **Figura III-28**), os quais foram extraídos e identificados por espectrometria de massa. A identificação dos digeridos dos 57 *spots* foi realizada pelo Dr. Ricardo Gomes (ITQB), através de um espectrómetro de massa MALDI-TOF-TOF 4800 Plus (Applied Biosystems).

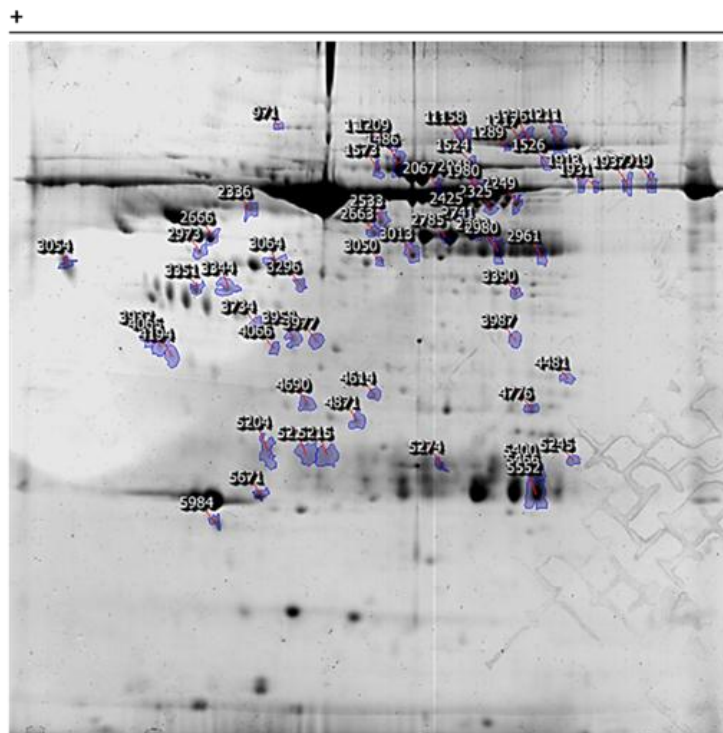


Figura III-28 – Gel de electroforese bidimensional de plasma de indivíduo controle utilizado como referência durante a análise realizada no SameSpots. Os spots assinalados foram extraídos para identificação por espectrometria de massa. Os sinais “+” e “-” indicam a orientação o ânodo e cátodo durante a IEF, respectivamente.

4.2 Identificação das proteínas diferencialmente expressas no plasma de indivíduos assintomáticos e doentes PAF não transplantados

Aos 57 spots identificados como diferencialmente expressos foram associadas 33 proteínas, algumas das quais foram reconhecidas em mais do que um spot e, do total, 11 spots não obtiveram identificação (ver Anexos, Tabela VII-9). Das proteínas identificadas (**Tabela III-7**) destacam-se as cadeias α , β e γ do Fibrinogénio, o Plasminogénio, a Albumina, as cadeias C das Igs, as Apolipoproteínas A1 e H, o RBP (do inglês, *Retinol Binding Protein*), a Haptoglobina e a HPR (do inglês, *Haptoglobin-Related Protein*), alguns elementos do Complemento (C3, factor B, C1qB), a macroglobulina α -2, o iPLA2- γ (do inglês, *Calcium-independent phospholipase A2- γ*), o IGHM DP (do inglês, *Ig mu heavy chain disease protein*), a Transferrina e a Clusterina. A associação de uma mesma proteína em diferentes spots foi recorrente, como por exemplo para a Albumina. Isto pode dever-se à presença de produtos de degradação que também são identificados e de modificações pós-traducionais que alteram sobretudo o ponto isoeléctrico de uma proteína.

Tabela III-7 – Identificação por espectrometria de massa das proteínas nos spots dos géis 2D assinalados como diferencialmente expressos (figura III-29). RBP – *retinol binding protein*. HPR – *Haptoglobin-related protein*. IGFM DP - *Ig mu heavy chain disease protein*. iPLA2- γ - *Calcium-independent phospholipase A2- γ* .

Spot	Identificação	Accession Code	Prot Score	Prot Score CI%	Total Ion Score	Total Ion Score IC%
971	Albumina	ALBU_HUMAN	698	100	528	100
1194	Factor B complemento	CFAB_HUMAN	721	100	611	100
	Macroglobulina α -2	A2MG_HUMAN	52	88,0	45	99,7
1573	cadeia C -Ig μ	IGHM_HUMAN	672	100	539	100
	IGHM DP	MUCB_HUMAN	571	100	411	100
	Transferrina	TRFE_HUMAN	175	100	112	100
2533	Apolipoproteína H	APOH_HUMAN	268	100	181	100
	cadeia C -Ig α -1	IGHA1_HUMAN	53	90,5	41	99,1
	cadeia C -Ig α -2	IGHA2_HUMAN	53	89,8	41	99,1
2663	Fibrinogénio β	FIBB_HUMAN	846	100	641	100
2067	Albumina	ALBU_HUMAN	1450	100	1139	100
	C3	CO3_HUMAN	128	100	54	99,9
1115	Plasminogénio	PLMN_HUMAN	479	100	347	100
	cadeia C -Ig γ -1	IGHG1_HUMAN	100	100	76	100
1289	cadeia C -Ig γ -1	IGHG1_HUMAN	83	99,9	59	99,9
1217	cadeia C -Ig γ -1	IGHG1_HUMAN	166	100	150	100
	cadeia C -Ig γ -2	IGHG2_HUMAN	69	99,8	65	99,9
	cadeia C -Ig γ -3	IGHG3_HUMAN	73	99,9	65	99,9
1226	cadeia C -Ig γ -1	IGHG1_HUMAN	361	100	313	100
1211	cadeia C -Ig γ -1	IGHG1_HUMAN	164	100	174	100
	cadeia C -Ig γ -2	IGHG2_HUMAN	56	95,1	47	99,7
	cadeia C -Ig γ -3	IGHG3_HUMAN	55	94,1	47	99,7
1526	Transferrina	TRFE_HUMAN	71	99,8	16	0
1913	Albumina	ALBU_HUMAN	574	100	424	100
1931	Albumina	ALBU_HUMAN	168	100	107	100
1937	Albumina	ALBU_HUMAN	390	100	299	100
1919	Albumina	ALBU_HUMAN	166	100	144	100
	iPLA2- γ	PLPL8_HUMAN	48	64,7	32	91,6
2249	cadeia C -Ig γ -2	IGHG2_HUMAN	73	99,9	66	99,9
	cadeia C -Ig γ -3	IGHG3_HUMAN	72	99,9	66	99,9
	cadeia C -Ig γ -4	IGHG4_HUMAN	72	99,9	53	99,9
	Fibrinogénio α	FIBA_HUMAN	72	99,9	53	99,9
2792	Fibrinogénio β	FIBB_HUMAN	71	99,8	45	99,6
2741	Fibrinogénio β	FIBB_HUMAN	73	99,9	61	99,9
2425	cadeia C -Ig α -1	IGHA1_HUMAN	145	100	131	100
	Albumina	ALBU_HUMAN	107	100	61	99,9
3390	Fibrinogénio α	FIBA_HUMAN	237	100	167	100
3631	Fibrinogénio α	FIBA_HUMAN	46	46,5	31	85,2
3987	cadeia C -Ig γ -1	IGHG1_HUMAN	246	100	200	100
4763	Fibrinogénio α	FIBA_HUMAN	659	100	538	100
4776	Fibrinogénio α	FIBA_HUMAN	404	100	316	100
5245	C1qB	C1QB_HUMAN	179	100	159	100
	cadeia C -Ig λ -3	LAC3_HUMAN	102	100	68	99,9
	cadeia C -Ig λ -6	LAC6_HUMAN	102	100	68	99,9
	cadeia C -Ig λ -7	LAC7_HUMAN	88	100	68	99,9

Tabela III-7 (continuação) – Identificação por espectrometria de massa das proteínas nos spots dos géis 2D assinalados como diferencialmente expressos (figura III-29). RBP – retinol binding protein. HPR – *Haptoglobin-related protein*. IGFM DP - *Ig mu heavy chain disease protein*. iPLA2- γ - *Calcium-independent phospholipase A2- γ* .

Spot	Identificação	Accession Code	Prot Score	Prot Score CI%	Total Ion Score	Total Ion Score IC%
4987	Fibrinogénio α	FIBA_HUMAN	271	100	174	100
5274	cadeia C -Ig λ -1	LAC1_HUMAN	271	100	221	100
	cadeia C -Ig λ -3	LAC3_HUMAN	382	100	331	100
	cadeia C -Ig λ -6	LAC6_HUMAN	368	100	331	100
	cadeia C -Ig λ -7	LAC7_HUMAN	357	100	331	100
	Albumina	ALBU_HUMAN	208	100	183	100
	cadeia C -Ig κ	IGKC_HUMAN	140	100	124	100
5400	Fibrinogénio α	FIBA_HUMAN	267	100	253	100
5466	cadeia C -Ig κ	IGKC_HUMAN	91	99,9	65	99,9
	Fibrinogénio α	FIBA_HUMAN	69	99,6	59	99,9
5552	cadeia C -Ig κ	IGKC_HUMAN	279	100	238	100
3050	Fibrinogénio β	FIBB_HUMAN	587	100	441	100
	Albumina	ALBU_HUMAN	211	100	165	100
5984	RBP 4	RET4_HUMAN	674	100	532	100
5623	Apolipoproteína A1	APOA1_HUMAN	179	100	79	100
5671	Apolipoproteína A1	APOA1_HUMAN	949	100	732	100
5204	cadeia C -Ig λ -1	LAC1_HUMAN	284	100	247	100
	cadeia C -Ig λ -2	LAC2_HUMAN	383	100	333	100
	cadeia C -Ig λ -3	LAC3_HUMAN	397	100	333	100
	cadeia C -Ig λ -6	LAC6_HUMAN	370	100	333	100
	cadeia C -Ig λ -7	LAC7_HUMAN	369	100	333	100
	região HII cadeia V-VI -Ig λ	LV403_HUMAN	143	100	136	100
5265	cadeia C -Ig λ -1	LAC1_HUMAN	286	100	235	100
	cadeia C -Ig λ -3	LAC3_HUMAN	402	100	351	100
	cadeia C -Ig λ -6	LAC6_HUMAN	388	100	351	100
	região SH cadeia V-III -Ig λ	LV301_HUMAN	99	100	92	100
4614	Albumina	ALBU_HUMAN	155	100	134	100
3937	Clusterina	CLUS_HUMAN	160	100	143	100
4066	Haptoglobina	HPT_HUMAN	366	100	291	100
	HPR	HPTR_HUMAN	55	93,9	42	99,2
3958	Albumina	ALBU_HUMAN	161	100	107	100
3734	Albumina	ALBU_HUMAN	67	99,6	55	99,9
3210	Albumina	ALBU_HUMAN	68	99,7	54	99,9
3070	Fibrinogénio γ	FIBG_HUMAN	198	100	183	100
3064	Fibrinogénio γ	FIBG_HUMAN	508	100	379	100
2336	cadeia C -Ig α -1	IGHA1_HUMAN	760	100	628	100
	cadeia C -Ig α -2	IGHA2_HUMAN	572	100	506	100

Algumas das proteínas identificadas já foram relacionadas com a PAF. Por exemplo, o Fibrinogénio e RBP são interactivos da TTR no plasma os quais estabilizam a sua estrutura tetramérica. Existe também uma relação entre a TTR e a Apo-AI, a qual medeia as interações entre o colesterol e a primeira (M. M. Sousa, Berglund, et al. 2000), servido ainda de substrato da actividade proteolítica da TTR (Liz et al. 2004). Recentemente a Albumina foi identificada como uma proteína do plasma com um papel importante na formação das fibras amilóides,

tendo sido descrita uma relação da sua função inversamente proporcional com a formação de fibras e progressão da doença (Kugimiya et al. 2011). A expressão diferencial do C1qB é de realçar, uma vez que foram recentemente descritos polimorfismos nos genes do complemento C1Q do complemento que podem influenciar o fenótipo da PAF V30M (Dardiotis et al. 2009).

Para perceber de que forma estas proteínas podem estar relacionadas com a Paramiloidose e influenciar vários processos do organismo, fez-se uma análise de expressão através do portal Reactome⁴, com recurso à ferramenta Expression Analysis. Neste, inserem-se as proteínas identificadas, com a formação de um *output* que indica quais as vias que se encontram afectadas e em que extensão. Na **Figura III-29** encontram-se as vias destacadas, juntamente com o número total de proteínas que possuem e o número de proteínas das mesmas que foram identificadas por espectrometria de massa. Embora tenham sido identificadas 33 proteínas distintas por espectrometria de massa, apenas 12 afectam directamente as vias identificadas por esta plataforma *online*.

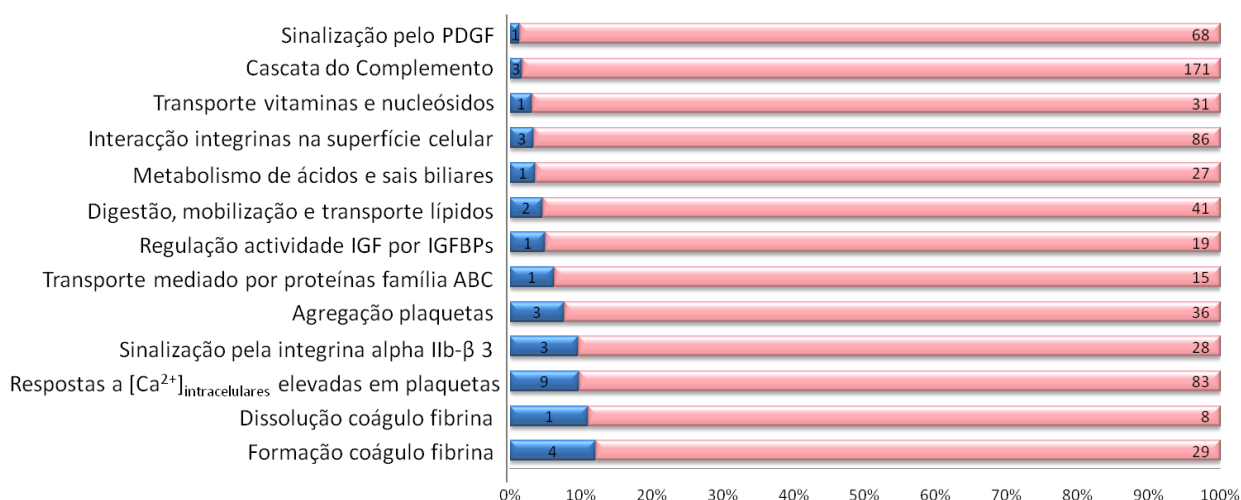


Figura III-29 – Processos biológicos com performances potencialmente alteradas e diferenciais entre indivíduos assintomáticos e doentes PAF não transplantados relativamente a indivíduos saudáveis. As barras a azul indicam o número de proteínas da via que foram identificadas na análise por 2D e a rosa o número total de proteínas da via.

Dos 12 processos assinalados cuja *performance* poderá ser afectada pelas proteínas identificadas, apenas aqueles relacionadas com a formação e dissolução dos coágulos de fibrina se encontram com uma *performance* potencialmente alterada em maior extensão (13 e 10%) (**Figura III-29**). Contudo, não se pode descartar o papel dos restantes na PAF, quer como perturbação causal ou consequente. Por exemplo, a digestão, mobilização e transporte de lípidos encontra-se potencialmente alterada em indivíduos PAF. Esta identificação vai ao

⁴ <http://www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html>. Base de dados de vias e processos biológicos humanos que fornece um conjunto de ferramentas para tarefas como pesquisas elementares, análise de genoma, identificação e modelação de vias.

encontro de um estudo recente que reporta o envolvimento dos lípidos de membrana no processo de agregação e formação de fibras amilóides de TTR (Hou et al. 2008). Já as vias de transporte de vitaminas e nucleósidos, de resposta de $[Ca^{2+}]_{intracelulares}$ elevadas, do metabolismo dos ácidos e sais biliares e dos lípidos apresentam um denominador comum: a Albumina, a qual aparenta uma relação de protectora na PAF (Kugimiya et al. 2011).

Decidiu-se averiguar quais as proteínas intervenientes em cada uma das vias assinaladas (ver Anexos, Tabela VII-10), e em quantas destas participam, concluindo-se que a identificação de algumas destas vias têm origem num denominador proteico comum (**Figura III-30**). Por exemplo, o Fibrinogénio participa em 5 das 12 vias, o Plasminogénio e a Albumina em 4 das 12, enquanto que o C3 e a Transferrina estão envolvidos em apenas 1.

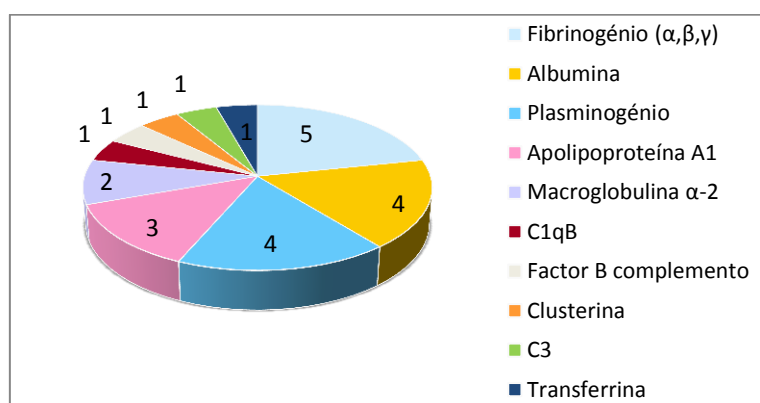


Figura III-30 – Representação do número de vias em que participam as proteínas identificadas como diferencialmente expressas entre indivíduos controlo, assintomáticos e doentes PAF não transplantados.

Algumas das vias descritas apresentam apenas um interveniente (Figura III-30), pelo que se torna impossível concluir sobre seu o envolvimento na PAF exclusivamente a partir dos dados gerados por 2D. Porém, pensa-se que um aumento dos replicados técnicos permitirão um aumento do número de proteínas identificadas (dentro do intervalo de confiança usado), o que por sua vez poderá ter relevância ao nível destas e outras possíveis vias cujo desempenho esteja alterado na Paramiloidose. Considerando os resultados de Western blot apresentados, um exemplo do que seria expectável com o aumento do número destes replicados é a identificação do Glioxalase I como proteína diferencialmente expressa, assim como a identificação da via a que pertence.

Para além das identificações realizadas, através da análise de PCA dos géis 2D mostrou-se uma separação clara entre assintomáticos, controlos e doentes PAFNT. Esta observação parece importante para promover a continuação da procura de diferenças entre os

grupos assintomáticos e sintomáticos da Paramiloidose, a qual pode passar pela técnica aqui usada, assim como explorar as diferenças aqui encontradas.

IV - DISCUSSÃO

O modelo de patogénese da PAF, baseado em estudos *in vitro*, assenta na perda de estabilidade do tetrâmero da TTR devido à ocorrência de mutações pontuais na sua cadeia polipeptídica (Hurshman et al. 2004; Sebastião et al. 1998) e nos conceitos de que os processos de agregação proteica e formação de fibras amilóides são dependentes da concentração e do tempo (Estrada & Soto 2007; J. E. Kang et al. 2009). Uma vez que a maioria dos portadores de uma mutação amiloidogénica da TTR são heterozigóticos, segundo este modelo de amiloidogénese, com a progressão clínica da PAF dever-se-ia acompanhar um aumento da variante V30M. É neste aspecto que se destaca o estudo dos indivíduos num estágio assintomático, indispensáveis para que seja possível avaliar a quantidade das formas de TTR ao longo do desenvolvimento desta condição. Neste trabalho, a não verificação de uma alteração da razão das duas variantes de TTR entre assintomáticos, indivíduos com expressão clínica da PAF e indivíduos saudáveis (não portadores de mutações conhecidas para a TTR) contesta o modelo de patogénese actualmente aceite. Além de se ter mostrado que a proporção entre as variantes V30M e *wild-type* da TTR em circulação é idêntica em indivíduos assintomáticos e PAFNT, mantendo uma relação de 40% vs 60%, observou-se ainda que esta relação se manteve constante ao longo do tempo, em pacientes que receberam um fígado PAF (DLTs, ver Anexo Figura VII-33). Estes resultados provam que em portadores portugueses heterozigóticos da mutação V30M a quantidade de TTR mutada no plasma permanece inalterada durante o aparecimento de sintomas e a progressão da Paramiloidose, e indicam que a quantidade relativa de TTR mutante em circulação não está relacionada, pelo menos de forma directa, com a progressão da doença. Os dados adquiridos apontam portanto para o envolvimento de factores para além dos genéticos que serão determinantes na progressão e aparecimento desta patologia, e reforça a necessidade de procura de um modelo mais conciso que pondere e reflecta o envolvimento dos vários intervenientes na PAF.

É de interesse mencionar que um estudo recente propõe (mas não verifica) uma menor quantidade de TTR mutada no sangue de portadores suecos heterozigóticos – os quais têm um quadro clínico amenizado em comparação à população portuguesa afectada – como uma possível explicação para as diferenças observadas entre as duas populações (Olsson et al. 2010). Porém, o trabalho aqui desenvolvido torna este cenário pouco provável, uma vez que indivíduos assintomáticos (portugueses) não apresentam quantidades inferiores da variante mutada em relação aos doentes PAF não transplantados. Foi recentemente descrito que os depósitos amilóides encontrados na PAF apresentam uma contribuição substancial para a sua formação da proteína nativa (*wild-type*), a qual tende a aumentar com a idade. Em pacientes

heterozigóticos mais jovens, a quantidade de TTR *wild-type* foi determinada como 40%, aumentando para 50 com o avanço da idade (Tsuchiya-Suzuki et al. 2011).

Considerando 1) que a quantidade relativa da variante V30M da TTR em circulação não varia com a progressão da doença e 2) que depósitos amilóides de pacientes PAF apresentam uma composição substancial da forma *wild-type* da TTR, torna-se evidente a presença de factores não genéticos por detrás das mutações que desempenham um papel relevante no mecanismo molecular fundamental da PAF. Conforme discutido anteriormente, estudos *in vitro* afirmam que é a presença de uma mutação da cadeia polipeptídica da TTR que conduz à dissociação do tetrâmero como consequência de uma estabilidade estrutural diminuída (Hurshman et al. 2004), que leva a formação de estruturas não nativas com capacidade de agregação e formação de depósitos amilóides. Este é o fundamento de muitas das abordagens terapêuticas que hoje em dia se estudam, baseadas no desenvolvimento de ligandos estabilizadores do tetrâmero de TTR. Embora apresente uma explicação lógica e óbvia para o sucesso do transplante hepático em travar a progressão da PAF, apresenta grandes limitações. Por exemplo, a TTR não mutada forma também depósitos amilóides na SSA (P Westermark et al. 1990), sugerindo que as mutações devem apenas modificar a natureza amilóide intrínseca da TTR, mas não são o factor determinante da formação das fibras e da toxicidade celular. Por outro lado, mesmo após o transplante de fígado, a TTR *wild-type* produzida também forma fibras amilóides (Liepnieks et al. 2010) e a sobrevivência após esta intervenção cirúrgica está associada com a progressão da neuropatia devido à deposição contínua de amilóide derivada da forma *wild-type*. Também é de realçar que a *age onset* pode variar décadas em indivíduos portadores de uma mesma mutação e entre gémeos homozigóticos (Munar-Qués et al. 1999). A maioria dos portadores de mutações amiloidogénicas da TTR são heterozigóticos, mas seria esperar que portadores homozigóticos mostrassem um fenótipo no geral mais severo, com sintomas agravados em relação aos primeiros. Não só tal não se verifica (Koike et al. 2009; M. Tanaka et al. 1988), como alguns sujeitos (homo e heterozigóticos) permanecem assintomáticos durante toda a sua vida (Rudolph et al. 2008). A partir dos resultados do trabalho desenvolvido exclui-se a quantidade de TTR circulante como indicador de *age onset*, estado de progressão da doença e prognóstico, uma vez que a razão entre TTR *wild-type* e mutada (V30M) é idêntica em todas as situações comparadas: portadores sintomáticos, assintomáticos e pacientes que receberam um transplante em dominó.

Os dois factores não genéticos mais importantes que poderão influenciar directamente a estrutura proteica e a sua função são os interactuantes e as modificações pós-traducionais. De facto, uma das razões pelas quais a TTR não forma amilóide no sistema nervoso central é

por causa da sua ligação ao RBP. Por outro lado, as modificações pós-traducionais são ferramentas biológicas importantes para a produção de proteínas que variam em função, estrutura e apresentem interacções proteína-proteína diferenciadas. No entanto, quando uma modificação é extensa, não enzimática e não controlada como acontece com a glicação, os efeitos observados para diferentes proteínas podem ser nocivos para a sua estrutura ou função. As proteínas modificadas por AGEs são insolúveis, apresentam um elevado número de ligações cruzadas que alteram a sua estrutura, e são tóxicas para as células animais em cultura (Brownlee 1995; Baynes & Thorpe 1999). Exibem ainda uma resistência à proteólise e uma estrutura em folhas beta, à semelhança do material isolado de diversos depósitos amilóides (Colaco & Harrington 1994). Existem fortes evidências de modificações pós-traducionais no contexto das doenças amilóides e, a glicação – também encontrada na PAF – parece ser um denominador comum nesta categoria patológica (Vitek et al. 1994; Castellani et al. 1996). Esta hipótese foi reforçada com a detecção de AGEs nas fibras de TTR (Gomes et al. 2005; Nyhlin et al. 2000).

Os resultados obtidos proporcionam uma ligação adicional da glicação à PAF, com a observação diferencial de um sinal com tendência a aumentar em estados sintomáticos da doença. Por outro lado, o aumento de expressão de enzimas protectores contra a glicação derivada do metilglioxal foi também detectada, mostrando uma relação inversa com os níveis de Argpirimidina. Isto é, em pacientes com níveis elevados de glicação o enzima Glioxalase I não estava aumentado, ao contrário de indivíduos assintomáticos que mostraram níveis menores desta modificação pós-traducional, simultaneamente com um aumento significativo da expressão deste enzima. Dada a ausência de um sinal homogéneo entre doentes PAFNT e indivíduos assintomáticos para este enzima e o papel que desempenha no metabolismo do MGO, especula-se que a via dos Glioxalases actua como mecanismo de protecção nestes últimos e não nos primeiros, razão pela qual se observam níveis de Argpirimidina mais elevados em doentes PAFNT. Também foi observado que o Aldose Reductase se encontra activo em condições basais, uma vez que a intensidade do sinal observado para todos os indivíduos (**Figura III-26**) é idêntica. Embora no Homem não seja a principal via de desintoxicação do MGO, é curioso ver que não existe uma activação desta na presença de elevados níveis de glicação, assim como não acontece com o Glo1 que se encontra apenas aumentado nos indivíduos assintomáticos. A razão pela qual a resposta/expressão deste não se encontra ampliada em doentes PAFNT (com níveis elevados de glicação consequentes) deverá ser investigada com maior pormenor, tal como a não activação do AR na de níveis aumentados de glicação derivada do MGO.

A presença de elevados níveis de glicação no plasma destes doentes é surpreendente: não só não apresentam distúrbios no metabolismo da glucose, como mostram estados transientes de hiperinsulinémia após a administração oral de glucose (Y. Ando et al. 1991), quando normalmente a formação de AGEs depende da concentração plasmática de glucose (associada a condições hiperglicémicas), metilglioxal e outros agentes de glicação (Makita et al. 1991), os quais estão fortemente associados às complicações da diabetes. Porém, os níveis de glicação também aumentam em condições de insuficiência/falha renal, onde os níveis de AGEs formados são independentes da concentração de glucose no plasma. Falta esclarecer qual o papel dos AGEs na PAF, se um adjuvante do mecanismo de patogénese ou uma consequência do mesmo, uma vez que são reportados casos de doença renal em doentes PAF. Porém, o envolvimento da glicação noutras patologias de perfil neurodegenerativo como as doenças de Alzheimer e Parkinson, onde ocorre a acumulação de AGEs em depósitos amilóides (S. Du Yan et al. 1997; Castellani et al. 1996; G Münch et al. 2000), é notório. Em conformidade com o que se observa com os doentes paramiloidóticos, indivíduos que sofram destas doenças apresentam por norma condições normais de glicemia, pelo que a glicação deverá ser fruto do aumento generalizado da concentração de espécies carbonílicas reactivas precursoras de AGEs, como é o caso do MGO, e/ou diminuição do seu metabolismo (Baynes & Thorpe 1999).

Na doença de Alzheimer, verifica-se um aumento do conteúdo em AGE nas placas A β (Vitek et al. 1994), e a formação de AGEs em proteínas A β promove a nucleação e precipitação desta proteína, sugerindo um mecanismo adicional pelo qual a reacção de Maillard pode acelerar a progressão da AD (K. Chen et al. 2006). Alguns dados sugerem que a formação destes produtos de glicação seja um efeito secundário da própria patologia, no entanto, embora os níveis de AGE aumentem naturalmente com a idade, em doentes com Alzheimer o seu aumento é significativamente mais acentuado (Lüth et al. 2005). Por sua vez, pacientes com Parkinson mostram níveis diminuídos de GSH, em fases iniciais da doença. Esta escassez de GSH resulta numa actividade diminuída do sistema dos Glioxalases, reflectindo um *stress* carbonílico responsável pelo aumento da concentração de AGEs. Estas observações feitas em doenças conformacionais de carácter amilóide como a PAF apenas vêm reforçar o envolvimento da glicação nos mecanismos de agregação e formação de fibras amilóides.

No que toca aos interactuantes da TTR, é curioso notar que foram detectados como diferencialmente expressos o RBP e o Fibrinogénio. Como mencionado anteriormente, é a ligação do primeiro à TTR no cérebro uma das causas que impede a deposição desta proteína no sistema nervoso central, remetendo para a importância dos interactuantes como estabilizadores da conformação proteica nativa. Por outro lado, o Fibrinogénio foi

recentemente descrito como interactuante da TTR (G. da Costa et al. 2011) mas também como um chaperone molecular (H. Tang et al. 2009), e foi sugerido que este tem a capacidade de interagir com espécies pré-fibrilares durante o processo de formação de fibras, redireccionando o processo de agregação (H. Tang et al. 2009). Para além de identificado nos géis 2D como diferencialmente expresso, também foi possível observar a sua expressão nos ensaios de western blot, onde indivíduos assintomáticos, controlo e doentes que receberam tratamento por transplante hepático (CLT) apresentam níveis globais de FIB inferiores aos demais (PAF e DLT) (**Figura III-26**). Isto é, assintomáticos mostram níveis de AGEs e Fibrinogénio semelhantes aos controlos e pacientes CLT, enquanto doentes PAFNT e transplantados com fígado dominó (DLT) apresentam níveis elevados quer de AGEs, quer de Fibrinogénio. Atendendo à recente descoberta da sua função de chaperone (H. Tang et al. 2009), é provável que os níveis aumentados de Fibrinogénio em doentes PAFNT e pacientes DLT representem uma resposta fisiológica à necessidade de chaperones extracelulares, dadas as condições patológicas da PAF que envolvem a destabilização do tetrâmero da TTR. Porém, é importante estabelecer uma ligação/relação entre os níveis de glicação observados com o possível papel de chaperone sobre a TTR, uma vez que se encontra bem documentada chaperones como alvo de glicação específica (como o caso do Hsp 27) com modulação da sua de função/actividade (Sakamoto et al. 2002; Ramasamy et al. 2006). Além disso, o FIB foi identificado como um dos principais alvos de glicação no plasma (G. da Costa et al. 2011). Estes resultados vêm realçar a importância do FIB como objecto de estudo na patogénese da PAF.

A patogénese da deposição amilóide na PAF V30M é multifactorial e pouco compreendida. Por exemplo, a TTR foi associada a lipoproteínas de baixa e elevada densidade em 1996 por Tanaka *et al* (Y. Tanaka et al. 1994), e em 2000 foi descrita a interacção entre a TTR e as partículas de HDL mediada pela Apo-AI (M. M. Sousa, Berglund, et al. 2000). Esta é uma proteína cujas variantes estão também relacionadas à amiloidose, caracterizadas pela deposição de fragmentos N-terminal (Benson 2003), mas mais importantes são os estudos que relacionam outras proteínas de carácter amilóide com as Apolipoproteínas, como o péptido A β solúvel que se encontra associado particularmente a fracções HDL, que complexa com as Apo-J e Apo-AI (Biere et al. 1996). Por outro lado, foi observado que a TTR liga-se a lípidos de membrana através de interacções electroestáticas de maior ou menor afinidade, e que a presença de colesterol na bicamada lipídica influencia a afinidade dessa ligação (Hou et al. 2008). A ligação aos lípidos de membrana está também correlacionada com a citotoxicidade induzida pelas variantes amiloidogénicas de TTR (Hou et al. 2005). Estudos anteriores noutras proteínas amiloidogénicas (como o péptido A β), mostraram que a ligação a lípidos da

membrana plasmática é um passo importante na agregação e citotoxicidade (Rymer & Good 2000; Subasinghe et al. 2003), e foi sugerido que a ligação fornecer um local favorável aos processos de *misfolding* e de agregação (Gorbenko & Kinnunen 2006; Yip et al. 2002; A. Chauhan et al. 2000). Estas observações e hipóteses identificam-se com os resultados obtidos ao longo deste trabalho, nomeadamente no que toca à Apo-AI e à identificação de vias potencialmente alteradas relacionadas com os lípidos. Embora tenha sido demonstrado que algumas mutações da PAF não interferem na formação do complexo TTR-HDL (M. M. Sousa, Berglund, et al. 2000), não é possível excluir que a presença da TTR nas HDL possa ser significativa quer no metabolismo da TTR quer na PAF.

Por último, foi recentemente descrito que pacientes PAF mostram níveis decrescentes de Albumina com a progressão da doença (Kugimiya et al. 2011), o que vai de encontro com os resultados obtidos, que mostram uma expressão diferencial desta proteína em controlos, assintomáticos e doentes PAFNT. A Albumina apresenta uma afinidade de ligação para a TTR elevada, sobretudo para formas amilóides da TTR em detrimento da *wild-type* (Kugimiya et al. 2011), e é o maior antioxidante no plasma, pelo que grande parte das propriedades antioxidantes deste fluído deve ser atribuída a esta proteína (Bourdon & Blache 2001). Adicionalmente, trabalhos mais recentes demonstraram que a Albumina suprime a formação de A β amilóide, o principal componente nas fibras amilóides da doença de Alzheimer, ao reduzir o *stress* oxidativo (Milojevic et al. 2007; Prajapati et al. 2011). Foi ainda descrito um aumento do *stress* oxidativo no plasma com a progressão da doença (diminuição da porção reduzida da Albumina com aumento da forma oxidada no plasma de doentes PAF) e a perda desta função antioxidante da Albumina levou a um aumento na velocidade de formação de fibras amilóides de TTR (Kugimiya et al. 2011). Especula-se que a função antioxidante da Albumina tenha um papel fundamental na formação amilóide da PAF.

Os resultados aqui apresentados reforçam a importância da hipótese formulada no início do trabalho: o envolvimento de factores não genéticos na evolução da doença ou manutenção de estados assintomáticos. É possível excluir a quantidade da variante mutante da TTR em circulação como biomarcador, uma vez que a relação entre TTR *wild-type* e V30M permanece inalterada com o aparecimento de sintomas e a progressão da patologia. Por outro lado, foi evidenciada a importância que factores não genéticos têm na doença, cujo mecanismo molecular de patogénese não se encontra totalmente esclarecido. A descoberta de níveis diferenciais de glicação, simultaneamente com expressões variáveis de interactuantes remete para o peso que estes factores terão na prevenção/favorecimento da agregação de TTR. A análise por 2D foi decisiva para a organização das amostras em 3 grupos distintos -

controles, assintomáticos e doentes PAFNT – e permitiu colocar em evidência algumas proteínas diferencialmente expressas entre os vários estádios progressivos da patologia (de assintomático a doente), realçando o potencial envolvimento de algumas vias na patogénese da PAF, como a do metabolismo dos lípidos, a formação e dissolução do coágulo de fibrina e a agregação de plaquetas.

V – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Durante a execução do trabalho apresentado focou-se substancialmente na investigação da hipótese do envolvimento dos factores não genéticos na patogénese da PAF e, do vasto leque disponível, quais os intervenientes mais prováveis de terem um efeito na sua patogenicidade. Inicialmente propôs-se averiguar a relação entre a quantidade relativa da variante mutada da TTR (V30M) em circulação com o desenvolvimento de sintomas e progressão clínica dos mesmos. Determinou-se então a proporção das variantes de TTR *wild-type* e V30M no plasma de indivíduos heterozigóticos assintomáticos e doentes não transplantados. Foi também fundamental proceder à quantificação da razão TTR *wild-type* e V30M nas amostras de plasma de indivíduos transplantados que, por terem problemas hepáticos graves receberam um fígado PAF ou que, por serem doentes PAF, receberam um fígado de cadáver *wild-type*.

Uma vez concluída esta etapa, onde se verificou que a quantidade de TTR mutada em circulação não está, pelo menos directamente, relacionada com o aparecimento de sintomas e progressão clínica da doença, estudou-se o envolvimento da glicação na PAF e procedeu-se à identificação de proteínas diferencialmente expressas no plasma entre indivíduos assintomáticos e doentes PAF não transplantados. Para além da determinação da razão das formas de TTR em circulação, o estudo de indivíduos assintomáticos deve ser ainda considerado para perscrutar as diferenças fenotípicas que já várias vezes foram descritas ao longo do trabalho, assim como o que as causa. Por exemplo, as diferenças detectadas a nível da glicação e do proteoma individual revelam-se importantes para a compreensão do mecanismo de patogénese da PAF. No entanto, o processo de integração destes resultados no sentido de estabelecer uma relação entre as alterações observadas e quaisquer modelos dos processos biológicos é sempre uma tarefa complexa.

Todos os resultados obtidos no decorrer do trabalho foram de extrema relevância, pois permitiram reforçar a premissa do envolvimento de factores não genéticos e apontam para um mecanismo de patogénese molecular multifactorial e mais complexo do que inicialmente previsto. Embora não tenham sido identificados e caracterizados os factores determinantes na Paramiloidose, evidenciaram-se alguns processos biológicos. Por exemplo, a digestão e mobilização de lípidos parece encontrar uma forte relação no mecanismo de agregação de várias proteínas de carácter amilóide. A glicação - além de estar já associada a várias doenças de cariz amilóide como Alzheimer, Parkinson e também a PAF - apresenta um padrão específico mas diferencial, observando-se níveis aumentados em indivíduos com demonstrações clínicas da doença. Por outro lado, o metabolismo de desintoxicação do metilglioxal – um dos principais agentes de glicação *in vivo* – aparenta também estar alterado,

e uma maior quantidade relativa do Glioxalase I parece ter um papel protector em indivíduos portadores da mutação V30M associados a estados clínicos assintomáticos. Seria interessante determinar as actividades enzimáticas dos enzimas envolvidos nas vias de desintoxicação do metilglioxal, nomeadamente o Glioxalase I e II e o Aldose Reductase, em indivíduos portadores da mutação V30M da TTR nos vários estádios (assintomáticos e doentes) para relacionar com a expressão destas proteínas no plasma. Por outro lado, seria também de interesse senão essencial, dosear os níveis de metilglioxal e também os níveis de GSH, uma vez que o glutatono na sua forma reduzida é essencial para que a primeira reacção do sistema dos Glioxalases tenha lugar. Além disso, uma vez que por norma os doentes com estas patologias não possuem níveis de glicemia anormais, deve-se estabelecer a razão deste *stress* carbonílico.

Pensa-se que seria também de valor estudar a estabilidade da TTR, *wild-type* e mutado, em condições que favoreçam níveis de glicação elevados mas que reproduzam as observações feitas neste trabalho, como a sobreexpressão do Glioxalase. Para tal, dever-se-ia recorrer a um modelo celular, como as *Saccharomyces cerevisiae*, para realizar este tipo de análise *in vivo* e manipular um conjunto de variáveis como a (sobre)expressão de certos enzimas ou o silenciamento dos seus genes.

Todos estes pontos devem ser tidos em conta em planos de estudos futuros, de forma a compreender de forma integrada os mecanismos associados à formação e deposição de fibras amilóides. Novas abordagens experimentais, que passem por estudos comparativos entre indivíduos em diferentes estádios da progressão da doença deverão ser complementares aos resultados aqui apresentados, e essenciais para que o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas possa surgir, assim como a identificação de biomarcadores de prognóstico.

VI – REFERÊNCIAS

- Adams, D. & Said, G., 1996. Ultrastructural immunolabelling of amyloid fibrils in acquired and hereditary amyloid neuropathies. *Journal of neurology*, 243(1), pp.63-7.
- Adams, D. et al., 2000. The course and prognostic factors of familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Brain : a journal of neurology*, 123 (Pt 7, pp.1495-504.
- Aebersold, R. & Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), pp.198-207.
- Ahmed, N. & Thornalley, P.J., 2002. Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated in vitro by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence. *The Biochemical journal*, 364(Pt 1), pp.15-24.
- Ahmed, N. et al., 2002. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified a. *The Biochemical journal*, 364(Pt 1), pp.1-14.
- Ahmed, N. et al., 2005. Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *The Journal of biological chemistry*, 280(7), pp.5724-32.
- Van Allen, M.W., Frohlich, J.A. & Davis, J.R., 1969. Inherited predisposition to generalized amyloidosis. Clinical and pathological study of a family with neuropathy, nephropathy, and peptic ulcer. *Neurology*, 19(1), pp.10-25.
- Andersson, K. et al., 2002. Only amyloidogenic intermediates of transthyretin induce apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 294(2), pp.309-14.
- Ando, Y. et al., 1997. Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 232(2), pp.497-502.
- Ando, Y. et al., 2002. Presence of autoantibody against ATTR Val30Met after sequential liver transplantation. *Transplantation*, 73(5), pp.751-5.
- Ando, Y. et al., 1991. Disturbed metabolism of glucose and related hormones in familial amyloidotic polyneuropathy: hypersensitivities of the autonomic nervous system and therapeutic prevention. *Journal of the autonomic nervous system*, 35(1), pp.63-70.
- Andrade, C., 1952. A peculiar form of peripheral neuropathy; familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain : a journal of neurology*, 75(3), pp.408-27.
- Araki, Shukuro et al., 1968. Polyneuritic Amyloidosis in a Japanese Family. *Arch Neurol*, 18(6), pp.593-602.
- Bakhti, M. et al., 2007. Consequential alterations in haemoglobin structure upon glycation with fructose: prevention by acetylsalicylic acid. *Journal of biochemistry*, 141(6), pp.827-33.

- Barrow, M.P., Burkitt, W.I. & Derrick, P.J., 2005. Principles of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and its application in structural biology. *The Analyst*, 130(1), pp.18-28.
- Bartalena, L. & Robbins, J., 1993. Thyroid hormone transport proteins. *Clinics in laboratory medicine*, 13(3), pp.583-98.
- Baynes, J.W. & Thorpe, S.R., 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48(1), pp.1-9.
- Beavis, R.C. & Chait, B.T., 1989. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 3(12), pp.436-9.
- Beavis, R.C., Chaudhary, T. & Chait, B.T., 1992. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 27(2), pp.156-158.
- Becker, P.E. et al., 1964. Paramyloidosis of peripheral nerves in Portugal. *Zeitschrift für menschliche Vererbungs- und Konstitutionslehre*, 37, pp.329-64.
- Bellovino, D. et al., 1998. In vitro and in vivo studies on transthyretin oligomerization. *Experimental cell research*, 243(1), pp.101-12.
- Bellovino, D. et al., 1996. Retinol binding protein and transthyretin are secreted as a complex formed in the endoplasmic reticulum in HepG2 human hepatocarcinoma cells. *Experimental cell research*, 222(1), pp.77-83.
- Benson, M.D., 1989. Familial amyloidotic polyneuropathy. *Trends in neurosciences*, 12(3), pp.88-92.
- Bergström, J. et al., 2005. Amyloid deposits in transthyretin-derived amyloidosis: cleaved transthyretin is associated with distinct amyloid morphology. *The Journal of pathology*, 206(2), pp.224-32.
- Biere, A.L. et al., 1996. Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *The Journal of biological chemistry*, 271(51), pp.32916-22.
- Bischoff, K.M., Shi, L. & Kennelly, P.J., 1998. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 260(1), pp.1-17.
- Blake, C.C. & Oatley, S.J., 1977. Protein-DNA and protein-hormone interactions in prealbumin: a model of the thyroid hormone nuclear receptor? *Nature*, 268(5616), pp.115-20.
- Blake, C.C. et al., 1978. Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *Journal of molecular biology*, 121(3), pp.339-56.
- Blake, C.C. et al., 1974. Structure of human plasma prealbumin at 2-5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. *Journal of molecular biology*, 88(1), pp.1-12.

- Block, W.D. et al., 1956. Primary systemic amyloidosis: a review and an experimental, genetic, and clinical study of 29 cases with particular emphasis on the familial form. *Medicine*, 35(3), pp.239-334.
- Bonifácio, M.J., Sakaki, Y. & Saraiva, M.J., 1996. "In vitro" amyloid fibril formation from transthyretin: the influence of ions and the amyloidogenicity of TTR variants. *Biochimica et biophysica acta*, 1316(1), pp.35-42.
- Booth, D.R. et al., 1998. Transthyretin Ile73Val is associated with familial amyloidotic polyneuropathy in a Bangladeshi family. Mutations in brief no. 158. Online. *Human mutation*, 12(2), p.135.
- Bouma, B. et al., 2003. Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. *The Journal of biological chemistry*, 278(43), pp.41810-9.
- Bourdon, E. & Blache, D., 2001. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxidants & redox signaling*, 3(2), pp.293-311.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248-54.
- Brett, M. et al., 1999. Transthyretin Leu12Pro is associated with systemic, neuropathic and leptomeningeal amyloidosis. *Brain : a journal of neurology*, 122 (Pt 2, pp.183-90.
- Brownlee, M., 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual review of medicine*, 46, pp.223-34.
- Bucala, R. & Cerami, A., 1992. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 23, pp.1-34.
- Bucciantini, M. et al., 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 416(6880), pp.507-11.
- Bucciarelli, L.G. et al., 2002. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 59(7), pp.1117-28.
- Buxbaum, J.N., 2007. Transthyretin and the transthyretin amyloidoses. *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases*, 6, pp.259–283.
- Canijo, M. & Andrade, C., 1969. Familial amyloidotic polyneuropathy. Electromyographic study. *Journal de génétique humaine*, 17(3), pp.281-8.
- de Carvalho, M. et al., 2000. New transthyretin mutation V28M in a Portuguese kindred with amyloid polyneuropathy. *Muscle & nerve*, 23(7), pp.1016-21.
- Castellani, R. et al., 1996. Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain research*, 737(1-2), pp.195-200.

- Chauhan, A., Ray, I. & Chauhan, V.P., 2000. Interaction of amyloid beta-protein with anionic phospholipids: possible involvement of Lys28 and C-terminus aliphatic amino acids. *Neurochemical research*, 25(3), pp.423-9.
- Chen, F. et al., 2004. Role for glyoxalase I in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), pp.7687-92.
- Chen, K., Maley, J. & Yu, P.H., 2006. Potential implications of endogenous aldehydes in beta-amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis. *Journal of neurochemistry*, 99(5), pp.1413-24.
- Coelho, T. et al., 1996. Compound heterozygotes of transthyretin Met30 and transthyretin Met119 are protected from the devastating effects of familial amyloid polyneuropathy. *Neuromuscular disorders : NMD*, 6, p.S20.
- Cohen, A.S. & Calkins, E., 1959. Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature*, 183(4669), pp.1202-1203.
- Colaco, C.A. & Harrington, C.R., 1994. Glycation: a pathological modification in neuropathies?: a hypothesis. *Neuroreport*, 5(8), pp.859-61.
- Colon, W. & Kelly, J W, 1992. Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry*, 31(36), pp.8654-60.
- Compton, S.J. & Jones, C.G., 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, 151(2), pp.369-74.
- Connors, Lawreen Heller et al., 2003. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 10(3), pp.160-84.
- Cooper, D.N. & Youssoufian, H., 1988. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human genetics*, 78(2), pp.151-5.
- da Costa, G. et al., 2009. Identification and quantitative analysis of human transthyretin variants in human serum by Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 16(4), pp.201-7.
- da Costa, G. et al., 2011. Beyond genetic factors in Familial Amyloidotic Polyneuropathy: protein glycation and the loss of Fibrinogen's chaperone activity. *Plos one - accepted*.
- da Costa, G. et al., 2010. A non-invasive method based on saliva to characterize transthyretin in familial amyloidotic polyneuropathy patients using FT-ICR high-resolution MS. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 4(6-7), pp.674-678.
- Costa, P.P., Figueira, A.S. & Bravo, F.R., 1978. Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(9), pp.4499-503.

- Dardiotis, E. et al., 2009. Complement C1Q polymorphisms modulate onset in familial amyloidotic polyneuropathy TTR Val30Met. *Journal of the neurological sciences*, 284(1-2), pp.158-62.
- Dickson, P.W., Aldred, A.R., et al., 1985. High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 127(3), pp.890-5.
- Dickson, P.W., Howlett, G.J. & Schreiber, G., 1985. Rat transthyretin (prealbumin). Molecular cloning, nucleotide sequence, and gene expression in liver and brain. *The Journal of biological chemistry*, 260(13), pp.8214-9.
- Ding, Q. & Keller, J.N., 2005. Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochimica et biophysica acta*, 1746(1), pp.18-27.
- Dunn, M.J. & Bradd, S.J., 1993. Separation and analysis of membrane proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 19, pp.203-10.
- Dyck, P.J. & Lambert, E.H., 1968. Dissociated sensation in amyloidosis: compound action potentials; quantitative histologic and teased fibers; and electron microscopic studies of sural nerve biopsies. *Transactions of the American Neurological Association*, 93, pp.112-5.
- Eanes, E.D. & Glenner, G.G., 1968. X-Ray Diffraction Studies on Amyloid Filaments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16(11), pp.673-677.
- Elovaara, I., Maury, C.P. & Palo, J., 1986. Serum amyloid A protein, albumin and prealbumin in Alzheimer's disease and in demented patients with Down's syndrome. *Acta neurologica Scandinavica*, 74(3), pp.245-50.
- Estrada, L.D. & Soto, C., 2007. Disrupting beta-amyloid aggregation for Alzheimer disease treatment. *Current topics in medicinal chemistry*, 7(1), pp.115-26.
- Farah, M.A. et al., 2005. Analysis of glycated insulin by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochimica et biophysica acta*, 1725(3), pp.269-82.
- Fleming, C.E., Nunes, A.F. & Sousa, M.M., 2009. Transthyretin: more than meets the eye. *Progress in neurobiology*, 89(3), pp.266-76.
- Foss, T.R., Wiseman, R.L. & Kelly, Jeffery W, 2005. The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates. *Biochemistry*, 44(47), pp.15525-33.
- Fu, M.X. et al., 1992. Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes*, 41 Suppl 2, pp.42-8.
- Fu, M.X. et al., 1994. Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*, 43(5), pp.676-83.

- Furtado, A.J., 2003. Domino liver transplantation using FAP grafts. HUC experience--hopes and realities. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 10 Suppl 1, pp.84-7.
- Garfin, D.E., 1990. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*, 182, pp.425-41.
- Getz, R.K., Kennedy, B.G. & Mangini, N.J., 1999. Transthyretin localization in cultured and native human retinal pigment epithelium. *Experimental eye research*, 68(5), pp.629-36.
- Ghisso, J., Wisniewski, T. & Frangione, B., 1994. Unifying features of systemic and cerebral amyloidosis. *Molecular neurobiology*, 8(1), pp.49-64.
- Gomes, R. et al., 2005. Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *The Biochemical journal*, 385(Pt 2), pp.339-45.
- Gorbenko, G.P. & Kinnunen, P.K.J., 2006. The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chemistry and physics of lipids*, 141(1-2), pp.72-82.
- Hamilton, J.A. et al., 1993. The x-ray crystal structure refinements of normal human transthyretin and the amyloidogenic Val-30-->Met variant to 1.7-Å resolution. *The Journal of biological chemistry*, 268(4), pp.2416-24.
- Hammarström, P, Schneider, F. & Kelly, J W, 2001. Trans-suppression of misfolding in an amyloid disease. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5539), pp.2459-62.
- Hammarström, Per et al., 2003. Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5607), pp.713-6.
- Healthcare, G.E., 2004. *2-D Electrophoresis: Principles and Methods*,
- Heeren, R.M. a et al., 2004. A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(4), pp.1048-58.
- Hellman, Urban et al., 2008. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid*, 15(3), pp.181-186.
- Herbert, J. et al., 1986. Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award. *Neurology*, 36(7), pp.900-11.
- Hochleitner, E.O. et al., 2005. Protein stoichiometry of a multiprotein complex, the human spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein: absolute quantification using isotope-coded tags and mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry*, 280(4), pp.2536-42.
- Hodge, J.E., 1953. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(15), pp.928-943.
- Hodge, J.E., 1955. The Amadori rearrangement. *Advances in carbohydrate chemistry*, 10, pp.169-205.

- De Hoffmann, E. & Stroobant, V., 2007. *Mass spectrometry: principles and applications* 3rd ed., Wiley-Interscience.
- Holmgren, G. et al., 1994. Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *Journal of medical genetics*, 31(5), pp.351-4.
- Holmgren, G. et al., 1988. Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden by RFLP analysis. *Clinical genetics*, 33(3), pp.176-80.
- Holmgren, G. et al., 1991. Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clinical genetics*, 40(3), pp.242-6.
- Holt, I.J. et al., 1989. MOLECULAR GENETICS OF AMYLOID NEUROPATHY IN EUROPE. *The Lancet*, 333(8637), pp.524-526.
- Hou, X. et al., 2008. Cholesterol and anionic phospholipids increase the binding of amyloidogenic transthyretin to lipid membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(1), pp.198-205.
- Hou, X. et al., 2005. Binding of amyloidogenic transthyretin to the plasma membrane alters membrane fluidity and induces neurotoxicity. *Biochemistry*, 44(34), pp.11618-27.
- Hurshman, A.R. et al., 2004. Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry*, 43(23), pp.7365-81.
- Izumoto, S. et al., 1992. Familial amyloidotic polyneuropathy presenting with carpal tunnel syndrome and a new transthyretin mutation, asparagine 70. *Neurology*, 42(11), pp.2094-102.
- Van Jaarsveld, P. et al., 1973. Polymorphism of Rhesus monkey serum prealbumin. Purification and partial structure. *The Journal of biological chemistry*, 248(22), pp.7898-903.
- Jacobson, D.R. et al., 1992. Transthyretin Pro55, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement. *Human genetics*, 89(3), pp.353-6.
- Jacobsson, B. et al., 1989. Transthyretin immunoreactivity in human and porcine liver, choroid plexus, and pancreatic islets. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 37(1), pp.31-7.
- Jespersen, S. et al., 1995. Quantitative bioanalysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 30(2), pp.357-364.
- Jonsén, E. et al., 2001. Early liver transplantation is essential for familial amyloidotic polyneuropathy patients' quality of life. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 8(1), pp.52-7.

- Kanda, Y. et al., 1974. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *The Journal of biological chemistry*, 249(21), pp.6796-805.
- Kang, J.E. et al., 2009. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5955), pp.1005-7.
- Kang, J.H., 2003. Modification and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by methylglyoxal. *Molecules and cells*, 15(2), pp.194-9.
- Karas, M. & Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, 60(20), pp.2299-301.
- Keetch, C. a et al., 2005. L55P transthyretin accelerates subunit exchange and leads to rapid formation of hybrid tetramers. *The Journal of biological chemistry*, 280(50), pp.41667-74.
- Kikuchi, S. et al., 2003. Glycation--a sweet tempter for neuronal death. *Brain research. Brain research reviews*, 41(2-3), pp.306-23.
- Kito, S. et al., 1980. Studies on familial amyloid polyneuropathy in Ogawa Village, Japan. *European neurology*, 19(3), pp.141-51.
- Klose, J., 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26(3), pp.231-43.
- Koenig, R.J., Blobstein, S.H. & Cerami, A., 1977. Structure of carbohydrate of hemoglobin Alc. *The Journal of biological chemistry*, 252(9), pp.2992-7.
- Koike, H. et al., 2009. Distinct characteristics of amyloid deposits in early- and late-onset transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Journal of the neurological sciences*, 287(1-2), pp.178-84.
- Krautwald, M. & Münch, Gerald, 2010. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins - A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? *Experimental gerontology*, 45(10), pp.744-51.
- Kugimiya, T. et al., 2011. Loss of functional albumin triggers acceleration of transthyretin amyloid fibril formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 91(8), pp.1219-28.
- Kuhla, B et al., 2006. Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiology of aging*, 27(6), pp.815-22.
- Kume, S. et al., 1995. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *The American journal of pathology*, 147(3), pp.654-67.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-685.

- Ledesma, M.D. et al., 1994. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry*, 269(34), pp.21614-9.
- Liepnieks, J.J., Zhang, L.Q. & Benson, M.D., 2010. Progression of transthyretin amyloid neuropathy after liver transplantation. *Neurology*, 75(4), pp.324-7.
- Liz, M.A. et al., 2004. Transthyretin, a new cryptic protease. *The Journal of biological chemistry*, 279(20), pp.21431-8.
- Liz, M.A. et al., 2009. Substrate specificity of transthyretin: identification of natural substrates in the nervous system. *The Biochemical journal*, 419(2), pp.467-74.
- Lo, T.W. et al., 1994. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *The Journal of biological chemistry*, 269(51), pp.32299-305.
- Luís, M.L., 1978. Electroneurophysiological studies in familial amyloid polyneuropathy--Portuguese type. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 41(9), pp.847-50.
- Lyons, T.J. et al., 1991. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes*, 40(8), pp.1010-5.
- Lüth, H.J. et al., 2005. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 15(2), pp.211-20.
- Makita, Z. et al., 1991. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *The New England journal of medicine*, 325(12), pp.836-42.
- Makover, A. et al., 1988. Plasma transthyretin. Tissue sites of degradation and turnover in the rat. *The Journal of biological chemistry*, 263(18), pp.8598-603.
- Mannervik, B. & Ridderström, M., 1993. Catalytic and molecular properties of glyoxalase I. *Biochemical Society transactions*, 21(2), pp.515-7.
- McCutchen, S.L., Colon, W. & Kelly, J W, 1993. Transthyretin mutation Leu-55-Pro significantly alters tetramer stability and increases amyloidogenicity. *Biochemistry*, 32(45), pp.12119-27.
- McCutchen, S.L. et al., 1995. Comparison of lethal and nonlethal transthyretin variants and their relationship to amyloid disease. *Biochemistry*, 34(41), pp.13527-36.
- McPherson, J.D., Shilton, B.H. & Walton, D.J., 1988. Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry*, 27(6), pp.1901-7.
- Melhus, H. et al., 1991. Retinol-binding protein and transthyretin expressed in HeLa cells form a complex in the endoplasmic reticulum in both the absence and the presence of retinol. *Experimental cell research*, 197(1), pp.119-24.

- Meretoja, J., 1973. Genetic aspects of familial amyloidosis with corneal lattice dystrophy and cranial neuropathy. *Clinical genetics*, 4(3), pp.173-185.
- Milojevic, J. et al., 2007. Understanding the molecular basis for the inhibition of the Alzheimer's A β -peptide oligomerization by human serum albumin using saturation transfer difference and off-resonance relaxation NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 129(14), pp.4282-90.
- Misrahi, A.M. et al., 1998. New transthyretin variants SER 91 and SER 116 associated with familial amyloidotic polyneuropathy. Mutations in brief no. 151. Online. *Human mutation*, 12(1), p.71.
- Monteiro, F.A. et al., 2006. Activation of ERK1/2 MAP kinases in familial amyloidotic polyneuropathy. *Journal of neurochemistry*, 97(1), pp.151-61.
- Morgan, P.E., Dean, R.T. & Davies, M.J., 2002. Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. *Archives of biochemistry and biophysics*, 403(2), pp.259-69.
- Munar-Qués, M. et al., 1999. Two pairs of proven monozygotic twins discordant for familial amyloid neuropathy (FAP) TTR Met 30. *Journal of medical genetics*, 36(8), pp.629-32.
- Münch, G et al., 2000. Crosslinking of alpha-synuclein by advanced glycation endproducts--an early pathophysiological step in Lewy body formation? *Journal of chemical neuroanatomy*, 20(3-4), pp.253-7.
- Nagaraj, R.H. et al., 2003. Enhancement of chaperone function of alpha-crystallin by methylglyoxal modification. *Biochemistry*, 42(36), pp.10746-55.
- Necula, M. & Kuret, J., 2004. Pseudophosphorylation and glycation of tau protein enhance but do not trigger fibrillization in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 279(48), pp.49694-703.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry* 4th ed., W. H. Freeman.
- Nelson, R.W., McLean, M.A. & Hutchens, T.W., 1994. Quantitative Determination of Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 66(9), pp.1408-1415.
- Noy, N., Slosberg, E. & Scarlata, S., 1992. Interactions of retinol with binding proteins: studies with retinol-binding protein and with transthyretin. *Biochemistry*, 31(45), pp.11118-24.
- Nyhlin, N. et al., 2000. Advanced glycation end product in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Journal of internal medicine*, 247(4), pp.485-92.
- Olsson, M. et al., 2010. A possible role for miRNA silencing in disease phenotype variation in Swedish transthyretin V30M carriers. *BMC medical genetics*, 11, p.130.
- Oya, T. et al., 1999. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *The Journal of biological chemistry*, 274(26), pp.18492-502.

- O'Brien, M., 1997. Introduction to the Maillard reaction. In C. Colaco, ed. *The Glycation Hypothesis of Atherosclerosis*. pp. 29-56.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry*, 250(10), pp.4007-21.
- Pan, S. et al., 2005. High throughput proteome screening for biomarker detection. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(2), pp.182-90.
- Peng, W.-P., Cai, Y. & Chang, H.-C., 2004. Optical detection methods for mass spectrometry of macroions. *Mass spectrometry reviews*, 23(6), pp.443-65.
- Perdigoto, R. et al., 2003. The Coimbra University Hospital experience in liver transplantation in patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Transplantation proceedings*, 35(3), p.1125.
- Persson, S. et al., 2000. Pigments and proteins in green bacterial chlorosomes studied by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(2), pp.450-6.
- Petersen, R.B. et al., 1997. Transthyretin amyloidosis: a new mutation associated with dementia. *Annals of neurology*, 41(3), pp.307-13.
- Prajapati, K.D., Sharma, S.S. & Roy, N., 2011. Current perspectives on potential role of albumin in neuroprotection. *Reviews in the neurosciences*, 22(3), pp.355-63.
- Quintas, A., Saraiva, M.J. & Brito, R.M., 1997. The amyloidogenic potential of transthyretin variants correlates with their tendency to aggregate in solution. *FEBS letters*, 418(3), pp.297-300.
- Quintas, A., Saraiva, M.J. & Brito, R.M., 1999. The tetrameric protein transthyretin dissociates to a non-native monomer in solution. A novel model for amyloidogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 274(46), pp.32943-9.
- Quintas, A. et al., 2001. Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *The Journal of biological chemistry*, 276(29), pp.27207-13.
- Racker, E., 1951. The mechanism of action of glyoxalase. *Journal of Biological Chemistry*, 190(2), pp.685-696.
- Ramasamy, R., Yan, S.F. & Schmidt, A.M., 2006. Methylglyoxal comes of AGE. *Cell*, 124(2), pp.258-60.
- Raz, A., Shiratori, T. & Goodman, D.S., 1970. Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma. *The Journal of biological chemistry*, 245(8), pp.1903-12.
- Refai, E. et al., 2005. Transthyretin constitutes a functional component in pancreatic beta-cell stimulus-secretion coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), pp.17020-5.

- Reilly, M.M. et al., 1995. Haplotype analysis of French, British and other European patients with familial amyloid polyneuropathy (met 30 and tyr 77). *Journal of neurology*, 242(10), pp.664-8.
- Reisner, A.H., Nemes, P. & Bucholtz, C., 1975. The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 64(2), pp.509-16.
- Reixach, N. et al., 2004. Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), pp.2817-22.
- Richard, J.P., 1993. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochemical Society transactions*, 21(2), pp.549-53.
- Riisøen, H., 1988. Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica*, 78(6), pp.455-9.
- Roepstorff, P., 1996. Mass spectrometry in the analysis of peptides and proteins, past and present. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 61, pp.1-7.
- Roepstorff, P. & Fohlman, J., 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry*, 11(11), p.601.
- Rudolph, T., Kurz, M.W. & Farbu, E., 2008. Late-onset familial amyloid polyneuropathy (FAP) Val30Met without family history. *Clinical medicine & research*, 6(2), pp.80-2.
- Rymer, D.L. & Good, T.A., 2000. The role of prion peptide structure and aggregation in toxicity and membrane binding. *Journal of neurochemistry*, 75(6), pp.2536-45.
- Saito, F. et al., 2001. A case of late onset cardiac amyloidosis with a new transthyretin variant (lysine 92). *Human pathology*, 32(2), pp.237-9.
- Sakaki, Y. et al., 1989. Human transthyretin (prealbumin) gene and molecular genetics of familial amyloidotic polyneuropathy. *Molecular biology & medicine*, 6(2), pp.161-8.
- Sakamoto, H. et al., 2002. Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *The Journal of biological chemistry*, 277(48), pp.45770-5.
- Salvi, F. et al., 1993. Transthyretin-related TTR hereditary amyloidosis of the vitreous body. Clinical and molecular characterization in two Italian families. *Ophthalmic paediatrics and genetics*, 14(1), pp.9-16.
- Saraiva, M.J., 2001. Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. *FEBS letters*, 498(2-3), pp.201-3.
- Saraiva, M.J. et al., 1992. A new transthyretin mutation associated with amyloid cardiomyopathy. *American journal of human genetics*, 50(5), pp.1027-30.

- Saraiva, M.J. et al., 1984. Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin). *The Journal of clinical investigation*, 74(1), pp.104-19.
- Saraiva, M.J. et al., 1983. Presence of an abnormal transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Transactions of the Association of American Physicians*, 96, pp.261-70.
- Saraiva, M.J. et al., 1990. Cardiac amyloidosis: report of a patient heterozygous for the transthyretin isoleucine 122 variant. *Scandinavian journal of immunology*, 32(4), pp.341-6.
- Schneider, F., Hammarström, P & Kelly, J W, 2001. Transthyretin slowly exchanges subunits under physiological conditions: A convenient chromatographic method to study subunit exchange in oligomeric proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 10(8), pp.1606-13.
- Schreiber, G. & Richardson, S J, 1997. The evolution of gene expression, structure and function of transthyretin. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 116(2), pp.137-60.
- Schuchardt, S. & Sickmann, A., 2007. Protein identification using mass spectrometry: a method overview. *EXS*, 97, pp.141-70.
- Sebastião, M.P., Saraiva, M.J. & Damas, A.M., 1998. The crystal structure of amyloidogenic Leu55 --> Pro transthyretin variant reveals a possible pathway for transthyretin polymerization into amyloid fibrils. *The Journal of biological chemistry*, 273(38), pp.24715-22.
- Sedmak, J.J. & Grossberg, S.E., 1977. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochemistry*, 79(1-2), pp.544-52.
- Seidler, N.W. & Seibel, I., 2000. Glycation of aspartate aminotransferase and conformational flexibility. *Biochemical and biophysical research communications*, 277(1), pp.47-50.
- Sekijima, Y. et al., 2003. Energetic characteristics of the new transthyretin variant A25T may explain its atypical central nervous system pathology. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 83(3), pp.409-17.
- Sen, S. et al., 2007. Effect of non-enzymatic glycation on esterase activities of hemoglobin and myoglobin. *Molecular and cellular biochemistry*, 301(1-2), pp.251-7.
- Serot, J.M. et al., 1997. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 63(4), pp.506-8.
- Shevchenko, A., 2001. Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 296(2), pp.279-83.
- Shevchenko, A. et al., 2001. Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 22(6), pp.1194-203.

- Sipe, J.D., 1992. Amyloidosis. *Annual review of biochemistry*, 61, pp.947-75.
- Soares, M L et al., 2004. Haplotypes and DNA sequence variation within and surrounding the transthyretin gene: genotype-phenotype correlations in familial amyloid polyneuropathy (V30M) in Portugal and Sweden. *European journal of human genetics : EJHG*, 12(3), pp.225-37.
- Soares, Miguel Luz et al., 2003. Human transthyretin intronic open reading frames are not independently expressed in vivo or part of functional transcripts. *Biochimica et biophysica acta*, 1626(1-3), pp.65-74.
- Soprano, D.R. et al., 1985. Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *The Journal of biological chemistry*, 260(21), pp.11793-8.
- Sousa, A et al., 1993. Familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden: geographical distribution, age of onset, and prevalence. *Human heredity*, 43(5), pp.288-94.
- Sousa, A et al., 1995. Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)-type I in Póvoa do Varzim and Vila do Conde (north of Portugal). *American journal of medical genetics*, 60(6), pp.512-21.
- Sousa, J.C. et al., 2007. Transthyretin influences spatial reference memory. *Neurobiology of learning and memory*, 88(3), pp.381-5.
- Sousa, M.M., Berglund, L. & Saraiva, M.J., 2000. Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I. *Journal of lipid research*, 41(1), pp.58-65.
- Sousa, M.M., Cardoso, I., et al., 2001. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *The American journal of pathology*, 159(6), pp.1993-2000.
- Sousa, M.M. et al., 2004. Deposition and passage of transthyretin through the blood-nerve barrier in recipients of familial amyloid polyneuropathy livers. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 84(7), pp.865-73.
- Sousa, M.M., Du Yan, S., et al., 2001. Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), pp.7576-86.
- Sousa, M.M., Du Yan, S., et al., 2000. Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor kB (NF-kB) activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(7), pp.1101-10.
- Stangou, A.J. & Hawkins, P.N., 2004. Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. *Current opinion in neurology*, 17(5), pp.615-20.
- Strupat, K., Karas, M. & Hillenkamp, F., 1991. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 111, pp.89-102.

- Subasinghe, S. et al., 2003. Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *Journal of neurochemistry*, 84(3), pp.471-9.
- Suhr, O B, Friman, S. & Ericzon, B.-G., 2005. Early liver transplantation improves familial amyloidotic polyneuropathy patients' survival. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 12(4), pp.233-8.
- Sundaram, M. et al., 1998. The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *The Journal of biological chemistry*, 273(6), pp.3336-42.
- Takei, Y.-ichi et al., 2007. Transthyretin-derived amyloid deposition on the gastric mucosa in domino recipients of familial amyloid polyneuropathy liver. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 13(2), pp.215-8.
- Tanaka, M. et al., 1988. Familial amyloidotic polyneuropathy without familial occurrence: carrier detection by the radioimmunoassay of variant transthyretin. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 51(4), pp.576-8.
- Tanaka, Y. et al., 1994. Changed affinity of apolipoprotein AII to high density lipoprotein (HDL) in patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) type I. *Biochimica et biophysica acta*, 1225(3), pp.311-6.
- Tang, H. et al., 2009. Fibrinogen has chaperone-like activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(3), pp.662-7.
- Tang, K. et al., 1993. Laser mass spectrometry of oligonucleotides with isomer matrices. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 7(6), pp.435-9.
- Tawara, S. et al., 1983. Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 116(3), pp.880-888.
- Teng, M.H. et al., 2001. Amyloid and nonfibrillar deposits in mice transgenic for wild-type human transthyretin: a possible model for senile systemic amyloidosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 81(3), pp.385-96.
- Terry, C.J. et al., 1993. Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications. *The EMBO journal*, 12(2), pp.735-41.
- Thornalley, P.J., 2003. Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 6), pp.1343-8.
- Thornalley, P.J., 1996. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General pharmacology*, 27(4), pp.565-73.

- Thornalley, P.J., 2008. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug metabolism and drug interactions*, 23(1-2), pp.125-50.
- Thornalley, P.J., Langborg, A. & Minhas, H S, 1999. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *The Biochemical journal*, 344 Pt 1, pp.109-16.
- Thorpe, S.R. & Baynes, J.W., 2003. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino acids*, 25(3-4), pp.275-81.
- Thorpe, S.R. & Baynes, J.W., 1996. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs & aging*, 9(2), pp.69-77.
- Thylén, C. et al., 1993. Modifications of transthyretin in amyloid fibrils: analysis of amyloid from homozygous and heterozygous individuals with the Met30 mutation. *The EMBO journal*, 12(2), pp.743-8.
- Théberge, R. et al., 2000. Detection of transthyretin variants using immunoprecipitation and matrix-assisted laser desorption/ionization bioreactive probes: a clinical application of mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(2), pp.172-5.
- Théberge, R. et al., 2011. Top-Down Analysis of Small Plasma Proteins Using an LTQ-Orbitrap. Potential for Mass Spectrometry-Based Clinical Assays for Transthyretin and Hemoglobin. *International journal of mass spectrometry*, 300(2-3), pp.130-142.
- Toyooka, K. et al., 1995. Familial amyloid polyneuropathy associated with transthyretin Gly42 mutation: a quantitative light and electron microscopic study of the peripheral nervous system. *Acta neuropathologica*, 90(5), pp.516-25.
- Tsuchiya-Suzuki, A. et al., 2011. Wild-type transthyretin significantly contributes to the formation of amyloid fibrils in familial amyloid polyneuropathy patients with amyloidogenic transthyretin Val30Met. *Human pathology*, 42(2), pp.236-43.
- Tsuzuki, T. et al., 1985. Structure of the human prealbumin gene. *The Journal of biological chemistry*, 260(22), pp.12224-7.
- Vander Jagt, D.L., 1993. Glyoxalase II: molecular characteristics, kinetics and mechanism. *Biochemical Society transactions*, 21(2), pp.522-7.
- Vander Jagt, D.L. & Hunsaker, L.A., 2003. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chemico-biological interactions*, 143-144, pp.341-51.
- Vander Jagt, D.L. et al., 2001. Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chemico-biological interactions*, 130-132(1-3), pp.549-62.

- Vatassery, G.T. et al., 1991. A sensitive assay of transthyretin (prealbumin) in human cerebrospinal fluid in nanogram amounts by ELISA. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 197(1), pp.19-25.
- Vestal, M.L. & Campbell, J.M., 2005. Tandem time-of-flight mass spectrometry. *Methods in enzymology*, 402, pp.79-108.
- Vitek, M.P. et al., 1994. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), pp.4766-70.
- Vlassara, H., 1994. Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 124(1), pp.19-30.
- Weber, K. & Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry*, 244(16), pp.4406-12.
- Westermarck, P et al., 1990. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(7), pp.2843-5.
- Westwood, M.E. & Thornalley, P.J., 1997. Glycation and Advanced Glycation Endproducts. In C. Colaco, ed. *The Glycation Hypothesis of Atherosclerosis*. pp. 57-87.
- Whitehead, A.S. et al., 1984. Cloning of human prealbumin complementary DNA. Localization of the gene to chromosome 18 and detection of a variant prealbumin allele in a family with familial amyloid polyneuropathy. *Molecular biology & medicine*, 2(6), pp.411-23.
- Yan, H. & Harding, J.J., 1997. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *The Biochemical journal*, 328 (Pt 2, pp.599-605.
- Du Yan, S. et al., 1997. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), pp.5296-301.
- Yazak, M. et al., 2000. Postmortem findings in two familial amyloidosis patients with transthyretin variant Asp38Ala. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 7(4), pp.270-7.
- Yip, C.M., Darabie, A.A. & McLaurin, J., 2002. Abeta42-peptide assembly on lipid bilayers. *Journal of molecular biology*, 318(1), pp.97-107.
- Yoshioka, K. et al., 1989. Haplotype analysis of familial amyloidotic polyneuropathy. Evidence for multiple origins of the Val----Met mutation most common to the disease. *Human genetics*, 82(1), pp.9-13.

- Zhang, H. et al., 2005. High throughput quantitative analysis of serum proteins using glycopeptide capture and liquid chromatography mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(2), pp.144-55.
- Zhang, S.-X. et al., 2010. Proteomic study of serum proteins in a type 2 diabetes mellitus rat model by Chinese traditional medicine Tianqi Jiangtang Capsule administration. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(4), pp.1011-4.
- Zólyomi, Z. et al., 1998. Transthyretin mutation (serine 84) associated with familial amyloid polyneuropathy in a Hungarian family. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 5(1), pp.30-4.

Páginas da internet

- (1) http://en.wikipedia.org/wiki/Transthyretin-related_hereditary_amyloidosis
(28 Abril 2011, 19h20)
- (2) http://www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/13
(22 Maio 2011, 16h)
- (3) http://www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/10
(22 Maio 2011, 21h30)
- (4) <http://www.mitosciences.com/PDF/western.pdf>
(23 Maio 2011, 11h)
- (5) <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=5A3F09D2-5056-8A76-4E96-30DFE2E1B731>
(24 Maio 2011, 10h)
- (6) http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php#ei
(26 Maio 2011, 18h)

VII –ANEXOS

Nos anexos o leitor pode encontrar resultados que complementam o texto dos capítulos anteriores, assim como o produto do trabalho desenvolvido durante a execução da tese de mestrado sob a forma de *abstract*.

1 - Tabelas

Tabela VII-8 – Concentração da proteína total em mg/mL nas amostras de plasma humano utilizadas ao longo do trabalho desenvolvido.

[Proteína total] (mg/mL)	
C6	72,46
C8	110,97
C9	83,34
AS PAF 18	63,47
AS PAF 19	74,29
AS PAF 20	59,37
PAFNT 8	73,59
PAFNT 10	58,94
PAFNT 16	51,51
DLT 12	70,15
DLT 7	91,31
DLT 11	71,98
DLT 10	100,42
CLT 2	56,63
CLT 11	77,47
CLT 12	78,71
CLT 7	68,85

Tabela VII-9 – Spots identificados nos géis 2D de indivíduos controlo, assintomáticos (AS PAF) e doentes PAF (PAFNT) pelo SameSpots, ordenados em função do valor da ANOVA (*p-value* < 0,05). Estão indicados o Fold e o MNV (média dos volumes normalizados) do spot identificado para os 3 grupos de estudo.

Spot	Anova	Fold	MNV		
			Controlos	AS PAF	PAFNT
2741	8,31E-08	4,9	3,12E+07	6,42E+06	1,84E+07
2325	8,91E-07	5,3	1,86E+07	3,53E+06	3,54E+06
5984	3,45E-07	11,5	2,55E+08	2,37E+06	2,22E+06
2663	5,50E-07	3,8	1,40E+07	3,65E+06	5,78E+06
1158	6,08E-07	5,5	1,37E+07	2,48E+06	3,57E+06
1217	5,56E-06	5,0	2,72E+07	5,42E+06	6,70E+06
5274	1,42E-05	4,7	9,61E+06	2,04E+06	3,96E+06
1115	2,17E-05	4,9	1,69E+07	3,42E+06	6,21E+06
1289	4,30E-05	11,0	9,34E+06	8,52E+05	1,08E+06
1226	5,41E-05	4,8	3,90E+07	8,13E+06	1,20E+07
1211	9,04E-05	4,4	6,12E+07	1,41E+07	1,72E+07
4066	9,99E-05	2,7	4,35E+06	1,60E+06	1,68E+06
3054	1,06E-04	9,6	2,67E+07	2,78E+06	8,91E+06
3210	1,48E-04	5,0	4,60E+07	9,41E+06	1,71E+07
1524	1,53E-04	4,2	2,06E+07	4,89E+06	1,10E+07
2048	2,04E-04	3,4	2,86E+07	8,29E+06	2,56E+07

Tabela VII-9 – Spots identificados nos géis 2D de indivíduos controlo, assintomáticos (AS PAF) e doentes PAF (PAFNT) pelo SameSpots, ordenados em função do valor da ANOVA (p -value < 0,05). Estão indicados o Fold e o MNV (média dos volumes normalizados) do spot identificado para os 3 grupos de estudo.

Spot	Anova	Fold	MNV		
			Controlos	AS PAF	PAFNT
1919	2,60E-04	3,9	1,52E+07	3,92E+06	7,23E+06
5245	2,89E-03	2,9	4,28E+06	1,49E+06	2,53E+06
3977	3,04E-04	2,4	7,49E+06	3,06E+06	5,09E+06
3958	3,13E-04	2,8	1,34E+07	4,72E+06	8,49E+06
3937	3,20E-04	2,9	1,63E+07	5,62E+06	7,19E+06
2973	3,29E-04	3,6	1,24E+07	3,39E+06	3,83E+06
1980	3,30E-05	2,9	3,80E+07	1,33E+07	3,38E+07
5265	3,54E-04	3,8	7,00E+07	1,83E+07	2,43E+07
3631	4,48E-04	2,8	1,52E+07	5,84E+06	7,43E+06
3013	4,49E-04	2,9	3,14E+07	1,08E+07	1,37E+07
5671	4,54E-04	6,0	2,31E+07	3,86E+06	9,49E+06
1931	5,17E-04	4,4	7,18E+06	1,61E+06	2,83E+06
3987	6,67E-04	2,2	5,68E+06	2,74E+06	2,60E+06
3344	7,98E-04	3,2	2,82E+07	8,76E+06	1,83E+07
1209	8,49E-04	3,6	1,20E+07	3,37E+06	5,05E+06
3070	9,29E-04	3,3	2,27E+07	6,80E+06	1,54E+07
4763	1,00E-03	2,9	2,76E+07	9,51E+06	1,21E+07
5400	1,00E-03	2,8	2,42E+07	8,54E+06	8,69E+06
1937	1,00E-03	3,4	1,34E+07	3,94E+06	7,87E+06
5623	1,00E-03	4,8	3,54E+07	7,36E+06	1,39E+07
5204	1,00E-03	2,9	2,85E+07	9,85E+06	1,28E+07
2336	1,00E-03	6,6	3,28E+07	4,98E+06	1,56E+07
6215	1,00E-03	4,2	2,74E+07	6,57E+06	1,59E+07
1913	2,00E-03	3,8	1,89E+07	4,99E+06	8,59E+06
5552	2,00E-03	3,4	1,56E+08	4,59E+07	1,03E+08
1194	2,00E-03	4,0	9,42E+06	2,33E+06	3,62E+06
1486	2,00E-03	2,2	1,05E+08	4,86E+07	7,55E+07
4614	2,00E-03	2,9	5,64E+06	2,57E+06	1,95E+06
1573	3,00E-03	3,1	1,58E+07	5,14E+06	1,40E+07
4194	3,00E-03	2,8	1,19E+07	4,26E+06	6,83E+06
4481	3,00E-03	1,7	3,21E+06	1,84E+06	1,89E+06
2533	4,00E-03	2,4	2,29E+07	9,40E+06	1,74E+07
5466	5,00E-03	2,8	1,93E+07	6,77E+07	1,03E+07
3064	6,00E-03	5,7	5,41E+07	9,45E+06	4,14E+07
2067	6,00E-03	3,4	1,58E+07	4,62E+06	1,26E+07
971	6,00E-03	2,7	3,20E+06	1,19E+06	1,39E+06
4987	8,00E-03	2,5	2,63E+07	1,05E+07	1,41E+07
4871	3,60E-02	2,0	9,20E+06	5,56E+06	4,56E+06
4690	4,90E-02	2,5	1,50E+07	6,46E+06	6,11E+06

Tabela VII-9 – Spots identificados nos géis 2D de indivíduos controlo, assintomáticos (AS PAF) e doentes PAF (PAFNT) pelo SameSpots, ordenados em função do valor da ANOVA ($p\text{-value} < 0,05$). Estão indicados o Fold e o MNV (média dos volumes normalizados) do spot identificado para os 3 grupos de estudo.

Spot	Anova	Fold	MNV		
			Controlos	AS PAF	PAFNT
2249	8,00E-03	3,6	1,95E+07	9,29E+06	5,37E+06
3734	1,10E-02	3,5	1,00E+07	2,84E+06	5,31E+06
2792	1,20E-02	4,7	1,78E+06	1,59E+06	7,49E+06
3296	1,30E-02	2,1	1,08E+07	5,26E+06	5,13E+06
2425	1,60E-02	2,8	5,37E+06	1,92E+06	4,07E+06
3390	1,80E-02	2,6	4,30E+06	1,63E+06	1,90E+06
4776	2,10E-02	2,4	7,02E+06	3,17E+06	2,98E+06
3050	2,50E-02	2,6	5,40E+06	2,08E+06	2,77E+06
1526	3,40E-02	3,4	1,34E+07	3,95E+06	9,87E+06

Tabela VII-10 – Processos biológicos potencialmente alterados e respectivas proteínas identificadas como diferencialmente expressas em portadores V30M assintomáticos e sintomáticos e indivíduos saudáveis, identificados no portal Reactome.

Vias	Proteínas intervenientes
Sinalização pelo PDGF	Plasminogénio
	C3
Cascata do Complemento	C1qB
	Factor B do Complemento
Transporte de vitaminas e nucleósidos	Albumina
Interação de integrinas na superfície celular	Fibrinogénio ($\alpha+\beta+\gamma$)
Metabolismo de ácidos e sais biliares	Albumina
	Albumina
Digestão, mobilização e transporte de lípidos	Apolipoproteína AI
Regulação da actividade de IGF por IGFs	Plasminogénio
Transporte mediado por proteínas da família ABC	Apolipoproteína AI
Agregação de plaquetas	Fibrinogénio ($\alpha+\beta+\gamma$)
Sinalização pela integrina α IIb- β 3	Fibrinogénio ($\alpha+\beta+\gamma$)
	Albumina
	Apolipoproteína AI
	Macroglobulina α 2
	Clusterina
Respostas a $[Ca^{2+}]_{intracelulares}$ elevadas em plaquetas	Fibrinogénio ($\alpha\beta\gamma$)
	Plasminogénio
	Transferrina
Dissolução do coágulo de fibrina	Plasminogénio
	Fibrinogénio ($\alpha+\beta+\gamma$)
Formação do coágulo de fibrina	Macroglobulina α 2

2 - Figuras

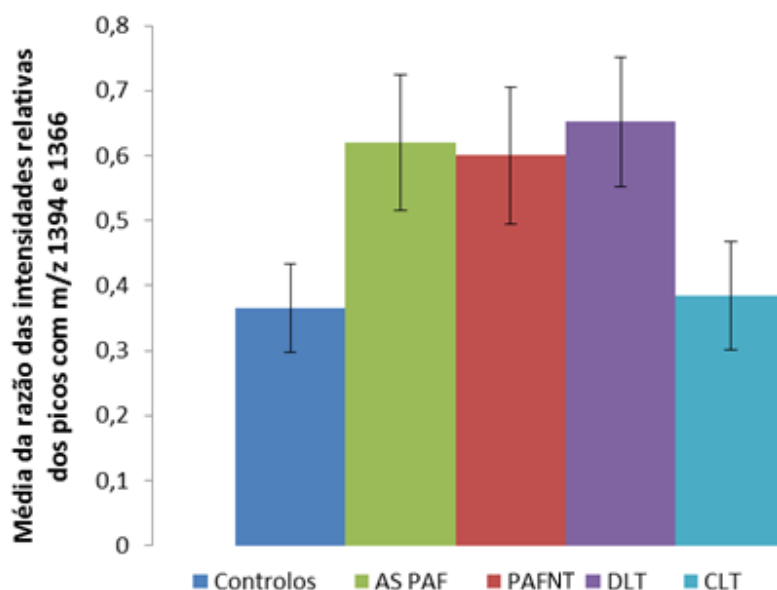


Figura VII-31 – Gráfico da média das razões das intensidades monoisotópicas dos picos com m/z 1394.6178 e 1366.7556 nos grupos de controlos, indivíduos assintomáticos, doentes PAFNT e pacientes transplantados que receberam um fígado PAF (DLTs) ou doentes PAF que receberam um fígado cadáver *wild-type* (CLTs).

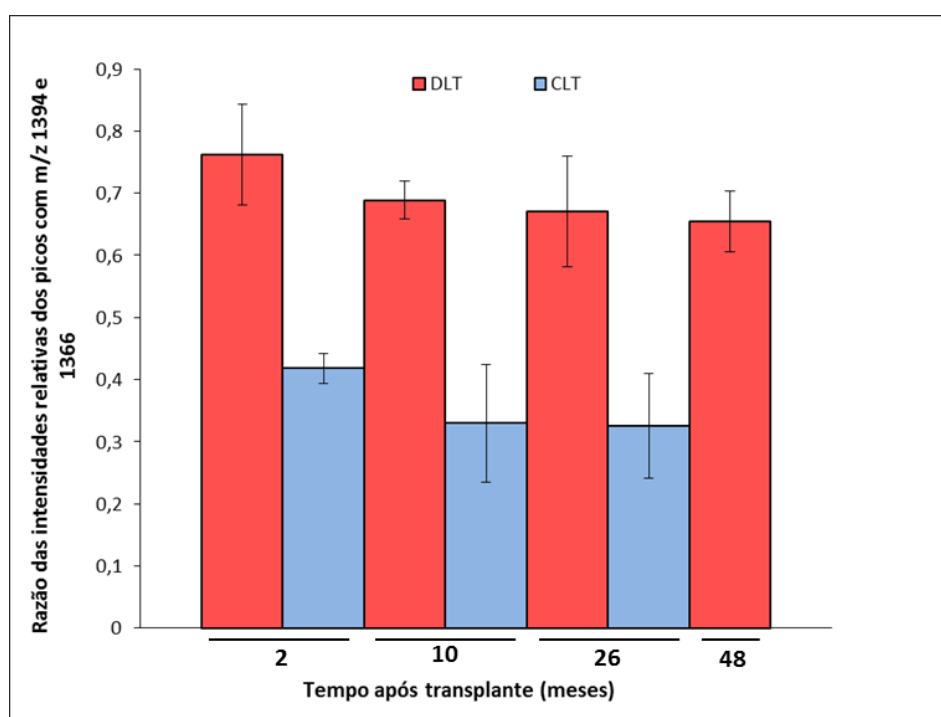


Figura VII-32 – Gráfico das razões das intensidades monoisotópicas relativas dos picos de m/z 1394.6178 e 1366.7556 em pacientes que receberam um fígado PAF (pacientes DLT) e um fígado de cadáver *wild-type* (pacientes CLT). Na imagem estão indicados o tempo (em meses) após o transplante hepático em que ocorreu a colheita de sangue.

3 – Artigos

Artigo sobre a quantificação das variantes *wild-type* e V30M da TTR no plasma

Título: The relative amounts of plasma transthyretin forms in Familial Transthyretin Amyloidosis: A quantitative analysis by Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry

Autores: Cristina Ribeiro-Silva^a, Samuel Gilberto^a, Ricardo A. Gomes^c, Élia Mateus^b, Estela Monteiro^b, Eduardo Barroso^b, Ana Varela Coelho^c, Gonçalo da Costa^a, Ana Ponces Freire^a, Carlos Cordeiro^a

Afiliação: ^aCentro de Química e Bioquímica, Departamento de Química e Bioquímica, FCUL, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal; ^bUnidade de Transplantação, Hospital Curry Cabral, 1069-166 Lisboa, Portugal; ^cInstituto de Tecnologia Química e Biológica, Av. da República Estação Agronómica Nacional 2780-157 Oeiras Portugal.

Estado: Aceite na revista Amyloid (Informa Healthcare).

Abstract: Familial transthyretin amyloidosis (ATTR) is a fatal autosomal dominant disease characterized by the formation of amyloid fibers, mainly composed of transthyretin (TTR). Protein aggregation and amyloid fiber formation are considered concentration dependent processes and since most ATTR patients are heterozygous it is crucial to determine the ratio between mutant and non-mutant TTR forms in human plasma. Using a high resolution mass spectrometry based approach we determined the ratio of TTR forms in ATTR patients, V30M mutation carriers, symptomatic and asymptomatic ones, as well as ATTR patients that received a wild type cadaveric liver transplant. Domino transplanted patients that received a liver from an ATTR patient were also investigated. We found that although wild type TTR is diminished in the plasma of non-transplanted ATTR patients comparatively to healthy subjects, the relationship with the V30M variant does not change with illness progression. Those who received a wild type liver showed no mutant protein while domino transplanted patients presented the same relative amount of V30M as found in asymptomatic and symptomatic individuals. The V30M to wild type TTR ratio in plasma is the same for all ATTR patients studied, showing no variation with disease clinical progression. Our results point to the involvement of additional non-genetic factors on the pathogenesis of this disease.

Artigo sobre a agregação da α -sinucleína na saliva e uso como potencial biomarcador da FAP

Título: α -Synuclein aggregation in the saliva of Familial Amyloidotic Polyneuropathy patients: A potential biomarker

Autores: Ana Guerreiro^{a,#}, Gonçalo da Costa^{a,#}, Ricardo A. Gomes^b, Cristina Ribeiro-Silva^a, Samuel Gilberto^a, Élia Mateus^c, Estela Monteiro^c, Eduardo Barroso^c, Ana Coelho^b, Ana Ponces Freire^a, Carlos Cordeiro^a

Afiliação: ^aDepartamento de Química e Bioquímica, FCUL, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal; ^bInstituto de Tecnologia Química e Biológica, Av. da República Estação Agronómica Nacional 2780-157 Oeiras Portugal; ^cUnidade de Transplantação, Hospital Curry Cabral, 1069-166 Lisboa, Portugal; [#]G. da Costa and A. Guerreiro have contributed equally to this work.

Estado: Submetido à revista Amyloid (Informa Healthcare) e revisto com comentários menores.

Abstract: Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) is an autosomal dominant disease characterized by the formation of transthyretin (TTR) amyloid deposits. This crippling and fatal disease is associated with point mutations in TTR, a protein mainly produced in the liver. Hence, liver transplantation is the only treatment capable of halting disease progression. Ideally, liver transplantation should be performed as early as possible in the disease course before significant neurologic disability has been incurred. Early detection of disease before serious pathological lesions occur is crucial for the clinical management of patients and for morbidity delay. Unfortunately, the presence of TTR mutations by itself is not a predictor of disease onset or progression. In the present work, we observed an increased oligomerization of α -synuclein in the saliva of FAP symptomatic individuals comparatively to asymptomatic carriers of the same TTR mutation and healthy control subjects. Based on this observation, we propose monitoring α -synuclein oligomers in saliva as a biomarker of FAP progression. Since α -synuclein plays a major role in several neurodegenerative disorders, assessing its oligomerization state in this fluid provides a non-invasive approach to survey these pathologies.